



Anàlisi de les estratègies germinatives d'espècies halòfiles

Universitat de València:

Jardí Botànic – Dept. de Botànica i Geologia
de la Facultat de Ciències Biològiques

VNIVERSITAT
E VALÈNCIA  **Jardí Botànic**



Autor: Jose Aparici Malchirant

Tutor Acadèmic: Pilar Soriano Guarinos

Tutor Extern: Elena Estrelles Perpiñá

Curs 2017-18, Grau de Biologia

València, Febrer 2018

*Algunes vegades em trobe enmig del no-res;
i sovint enmig del no-res, apareixen els meus
pares, per indicar-me el camí. Dedicat a ells, per
eixa estranya combinació de raó i sentiment.*

ÍNDEX	Pàg.
Pròleg: justificació i motivació	5 - 6
Resum i conceptes clau	6 - 7
1. INTRODUCCIÓ	
1.1 Ambients estressants: caracterització dels sòls salins	8 - 9
1.2 Climatologia associada a ambients salins	9 - 10
1.3 Dinàmiques ecològiques d'ambients halòfils	10 - 11
1.4 Plantes adaptades a l'estrès salí: la vida vegetal halòfila i proposades de classificació	11 - 14
1.5 Cicle vital d'un halòfit: etapa germinativa	14 - 17
1.6 Estratègies de conservació vegetal	17 - 19
1.7 Objectius del projecte	20
2. MATERIALS I MÈTODES	
2.1 Determinació de la zona d'estudi	21
2.2 Descripció botànica i ecològica de <i>Mesembryanthemum nodiflorum</i> L.	22 - 23
2.3 Processament de les mostres vegetals	23 - 24
2.4 Protocols de germinació	24 - 30
2.5 Estudis de la permeabilitat de la coberta seminal	30 - 31
2.6 Anàlisi paramètric i estadístic	31 - 33
3. RESULTATS	
3.1 Caracterització morfològica de la llavor	34
3.2 Barreig inicial de temperatures i de llum	34
3.3 Tractaments pregerminatius	35 - 42
3.4 Visió global de la resposta germinativa derivada dels pretractaments	42 - 44
3.5 Estudis de permeabilitat de la coberta seminal	44
4. DISCUSSIÓ	45 - 49
5. CONCLUSIONS	49 - 50
Llista d'abreviatures i símbols	50 - 51
Reconeixements	51
Finançament	52
6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	52 - 60

PRÒLEG: JUSTIFICACIÓ I MOTIVACIÓ

La presència de sal edàfica és un motor de singularitats en multitud d'espais naturals. Obrint la finestra al segle passat, rellevants naturalistes prestaren atenció a les comunitats vegetals de saladars mediterranis i reivindicaren tots a una veu l'indiscutible valor botànic, ecològic i paisatgístic d'aquests (Costa & Boira, 1981; Alcaraz & De la Torre, 1988). Ara per ara, el procés d'unificació i actualització del conjunt de treballs de recerca entorn als distints aspectes dels ecosistemes salins està en camí de consolidar-se de la mà de nombrosos equips d'investigació, tant a escala nacional com internacional. Entre ells el grup científic I+D de Biologia de la Conservació Vegetal del Jardí Botànic de la Universitat de València.

Com vaig apreciar durant els mesos de col·laboració prèvia a la fase experimental del present projecte, en aquest grup del Botànic destaquen línies d'investigació gestionades pel Banc de Germoplasma amb la participació del Dept. de Botànica i Geologia. La influència de l'estrès salí en la biologia reproductiva d'espècies vegetals d'ambients costers i el seguiment tècnic d'aquestes i, l'anàlisi germinatiu, viabilitat i envelliment de llavors i espores són alguns dels fronts d'estudi. Essencials punts de partida de qualsevol preservació estratègica de la biodiversitat vegetal i restauració ecològica aplicada als saladars (Estrelles et al., 2004). I és que els ambients salins són sinònim d'hàbitats prioritaris, d'ecosistemes d'interès comunitari englobats en la xarxa Natura 2000, la iniciativa política europea més important en matèria de conservació del patrimoni natural.

Diverses són les raons que justifiquen la necessitat de preservar els ambients halòfils costers. Entre aquestes, constitueixen autèntics laboratoris en plena natura que permeten l'estudi de processos de distint origen: ecologia poblacional, edafològics, paleolimnològics, evolutius i/o biogeogràfics. Propers freqüentment als cordons dunars, són ecosistemes salobres que contenen una elevada productivitat biològica, exposada a les inundacions causades per temporals marítims o avingudes fluvials. A més, tot i que són espais poc representats, en el nostre cas, en el sud-est de la península Ibèrica són considerats refugi d'una rara, endèmica i amenaçada flora (Guara et al., 1998), les afinitats més pròximes de la qual s'ubiquen en les regions estepàries del Nord d'Àfrica i l'Àsia Central.

D'aquest mode, el batec del present projecte reivindica, fa visible la vulnerabilitat sistemàtica dels saladars a través de l'examinació de l'etapa més crítica del cicle vital d'una espècie halòfita, la de la germinació. I és que conviure amb factors d'inestabilitat

com la irregularitat pluviomètrica, la qual desencadena oscil·lacions en la salinitat edàfica, és un repte que posa en risc l'establiment, la supervivència de les poblacions vegetals.

Un històric degoteig de denúncies ciutadanes, reivindicacions ecologistes i informes tècnics han aconseguit la notable però insuficient implicació de l'administració pública en matèria de conservació *in situ*. En el nostre cas, articular rigorosament programes de gestió mediambiental adaptats a saladars, on la mà de l'home ha sigut nefasta, una altra vegada. Des de la segona meitat del segle passat, gran part del litoral valencià s'ha convertit en escenari d'una ferotge desfeta de drets naturals i, ha originat un alarmant retrocés del patrimoni biològic i fragmentació dels espais naturals.

L'opinió ciutadana de les localitats limítrofes desencadenà que marjaleres, saladars o cordons dunars foren considerats focus d'insalubritat i de plagues; motiu que comportà la indiscriminada degradació d'aquestes àrees a través de constants cremes i dessecacions per a donar pas a una seqüència temporal del paisatge, arrelada al territori valencià: arrossars, camps de cítrics i finalment, la rajola. Una alteració radical de la fisonomia de l'entorn i la transformació bioquímica del sòl per tal d'obtenir un rendiment agrícola exprés mitjançant les abusives pràctiques de l'agricultura mediterrània (Canales et al., 2011). El progressiu desplaçament de la flora autòctona, endèmica i per tant, l'accelerat empobriment de l'ecosistema és el desafortunat desenllaç a què assistim a hores d'ara.

RESUM

En ambients halòfils de clima mediterrani com els localitzats en el litoral sud alacantí, l'ecofisiologia de la germinació és afectada essencialment pel dèficit hídric estacional, les elevades temperatures i les propietats del sòl. En aquest marc d'irregularitat ambiental, s'establí la resposta de germinació integrada en el cicle vital de l'espècie herbàcia halòfita *Mesembryanthemum nodiflorum* L. per tal d'avançar en el coneixement del funcionament d'aquests ambients salins i així poder abordar futurs programes de conservació vegetal en praderies salines. El protocol de germinació òptim de l'espècie d'estudi s'aconsegueix a un rang tèrmic de 25/10°C i un fotoperíode de 12/12 h llum/obscuritat. La determinació d'un període latent de dormició física en les llavors desencadenà la inclusió en el protocol d'una sèrie de tractaments pregerminatius i la seua corroboració amb l'estudi de la permeabilitat de la coberta seminal. Superior a l'estratificació càlida i freda, als haloprímings i als xocs tèrmics, l'escarificació química (H₂SO₄) de llavors amb més del 90% de germinació aconseguit en 2-3 dies fou el pretractament més adequat. Dit això, factors com la prolongada dormició seminal, la generació d'un banc de llavors en el substrat i el caràcter

anual del cicle biològic de *M. nodiflorum* L. justifiquen la seua estratègia germinativa moderadament competitiva front a altres halòfites oportunistes a l'hora d'instal·lar-se les poblacions en el saladar.

Paraules clau: *Mesembryanthemum nodiflorum* L., espècies halòfiles, germinació, dormició, banc de llavors, estrès ambiental, saladar mediterrani.

ABSTRACT

In Mediterranean halophytic environments, such as those located in the southern coast of Alacant, the ecophysiology of seed germination is essentially affected by seasonal water deficit, the high temperatures and soil properties. Within this framework of environmental irregularity, determined the germination response integrated into the life cycle of the halophyte herbaceous specie *Mesembryanthemum nodiflorum* L. Plant of interest to advance in the knowledge of the salt marsh functioning and addressing future conservation programs in saline meadows. The optimal germination protocol of the study plant is done in a thermal range 25/10°C and a photoperiod of 12/12 h light/darkness. The deduction of a latent period in seeds called physical dormancy motivated the inclusion of different dormancy breaking treatments in the protocol. It corroborated by the seed coat permeability study. The chemical scarification (H₂SO₄) is more suitable pre-treatment than the warm and cold stratification, the halopriming tests and the thermal shocks. In fact, the scarify seeds originated significantly higher germination percentages (> 90% achieved in 2 or 3 days). That said, factors such as prolonged seed dormancy, the generation of a seed bank in the substrate or annual cycle of *M. nodiflorum* L. explain her moderately competitive strategy compared to other opportunistic halophytes at the time of colonizing the salt marsh.

Key words: *Mesembryanthemum nodiflorum* L., halophyte species, germination, dormancy, seed bank, environmental stress, Mediterranean salt marshes

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Ambients estressants: caracterització dels sòls salins

Tant en el camp de la conservació vegetal com en la indústria agroalimentària, les singularitats dels sòls salins motiven optimitzar els mecanismes de resistència dels cultius. Convertit en un repte urgent per a la civilització, el canvi global fomenta l'expansió de la salinitat en aqüífers, en més del 20% de les terres cultivades arreu del globus i quasi la meitat de la superfície potencial de regadiu (FAO, 2016). De fet, en aquelles regions àrides del globus amb prolongats períodes de sequera son les més vulnerables a aquesta realitat.

A trets generals, la naturalesa dels sòls salins es deu a l'origen de la salinitat d'acord la localització, la geomorfologia del saladar i l'ús que s'haja fet d'aquest (Alcaraz, 2012). D'aquest mode, en el procés de formació del saladar existeixen distints cicles de salinització i els de caràcter marí s'associen als saladars costers. En aquests, la sal de l'aigua prové de la capa freàtica, la qual està pròxima a la superfície. L'aigua ascendeix per capil·laritat, pateix una elevada taxa d'evapotranspiració i s'origina la cristallització de les sals que contenia en solució. Dit això, la salinitat es reforçada a causa d'escorrenties fluvials, microprecipitacions marines o la maresma que arrossega la càrrega granulomètrica (sals minerals) terra endins.

Tanmateix, la salinitat es classifica en primària o natural, la qual està distribuïda àmpliament arreu del planeta i s'incrementa a causa d'irregularitats climàtiques, hidrològiques i, processos d'erosió i sedimentació. Tot i que, des de fa segles, s'han potenciat els cicles d'essència antropogènica que han desencadenat l'anomenada salinitat secundària, la qual és lligada fonamentalment a l'ús excessiu de fertilitzants, els sistemes de drenatge ineficients o la sobreexplotació d'aqüífers.

Les limitacions edàfiques marquen l'especiació florística (Khan & Weber, 2006); en el cas de la sal, restringeix notablement la fisiologia i el metabolisme de les plantes més que ninguna altra substància que es trobe en condicions naturals. Inhibició manifestada en distints esglaons: tancament estomàtic i entrada limitada de CO₂, reducció de la turgència o desestabilització de l'activitat enzimàtica. En aquest sentit, la tolerància a l'estrès salí és la capacitat de combatre l'excés d'electròlits en l'àrea d'activitat de les arrels, entre altres situacions i és molt més complexa ja que està controlada per un entramat de processos bioquímics i fisiològics (Flowers & Colmer, 2008).

Com a regla general en la naturalesa i com ocorre amb altres tipus d'estrès, el salí és inversament proporcional a la taxa de creixement de la planta i es bifurca bàsicament en

ambdós tipus d'estrès abiòtic (Azcon-Bieto & Talón, 2008). Per una banda, l'estrès físic és aquell motivat pel dèficit hídric, anomalies tèrmiques, insolació, anaerobiosi o danys mecànics com l'abrasió dels vents marins. I per altra banda, l'estrès químic es vincula amb la toxicitat causada per la concentració d'ions salins o la carència de bioelements claus en la nutrició vegetal.

1.2 Climatologia associada a ambients salins

El factor clima i les seues fluctuacions és rellevant en l'estructura, funcionament i distribució de les comunitats vegetals halòfitas tant en saladars d'interior com costers (Alonso, 2000). Entre els indicadors referencials es troba el registre de temperatures (termotip) i precipitacions (ombrotip) (Rivas Martínez, 1983; Díaz, 2011-2017). Si ens fixem en la península Ibèrica, entre els pisos bioclimàtics d'influència mediterrània, el termomediterrani (àrees litorals) i mesomediterrani (àrees prelitorals) són característics en saladars costers. Precisament, en aquests últims predomina un ombrotip semiàrid i sec (precipitació anual entre 200 i 600 mm). Com ocorre en el conjunt d'àrees del macrobioclima mediterrani, la distribució anual de les pluges és més determinant que l'acumulació mitjana registrada, és a dir, un ritme pluviomètric estacional que incideix en els trets fenològics de la vegetació.

Dit això, la confluència d'un irregular rang tèrmic i pluviomètric en el sud-est ibèric, permet conformar diagrames ombrotèrmics com el mostrat en la Fig. 1. Aquest reflexa l'escassetat de precipitacions, l'existència d'un període d'aridesa estival o la suavitat de temperatures amb l'absència anual de gelades. Englobat gran part en el bioclima mediterrani xèric oceànic, el sud-est ibèric es troba entre les regions més àrides del continent europeu motivat per l'estabilitat anticiclònica

durant l'estiu, la qual es tradueix en un acusat dèficit hídric prolongat 3 – 4 mesos (àrea roja del diagrama representat). Circumstància en què els mecanismes de tolerància i prevenció de la vegetació halòfita es disparen per fer front a la sequera, la qual tendeix a

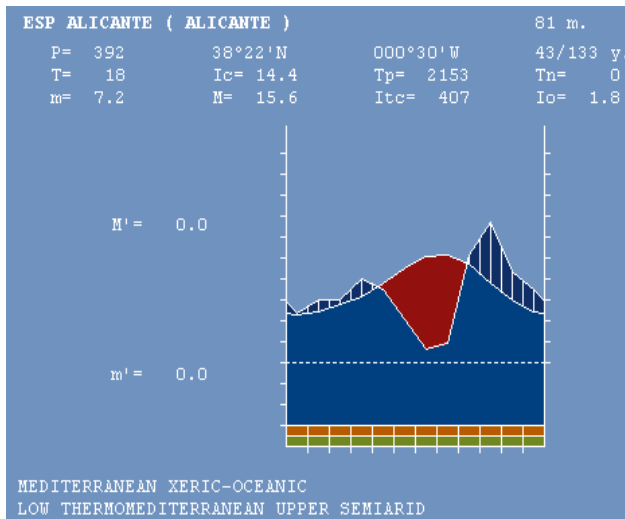


Fig. 1. Diagrama ombrotèrmic de la ciutat d'Alacant (Rivas-Martínez & Rivas-Sáenz, 1996-2009), dominat per un ombrotip semiàrid i termotip termomediterrani. La formació vegetal representativa són els matollars espinescents i praderes halòfitas.

estendre's més enllà del període estival ja que els fronts atlàntics o del nord-est carregats d'humitat arriben a l'arc mediterrani residuals i en forma de vent sec (Cantos, 2009). Tot i que, com observem en l'anterior Fig. 1, les darreries de l'estiu donen pas freqüentment a pics màxims anuals de precipitacions, són els episodis tardorencs de gota freda. En l'arc mediterrani, les seqüències sobtades i breus de pluges torrencials comporta que l'escorrentia no és retinguda per la vegetació, per la qual cosa predomina l'erosió potencial i la pèrdua de sòl.

En climes amb pluges tan escasses i amb ràpida evaporació, s'originen dràstics daltabaixos estacionals de la humitat edàfica i el consegüent aflorament de crostes de sal en la superfície, factor limitant per al desenvolupament de la planta. Els períodes de gota freda en tardor, en hivern són els responsables de dissoldre els cristalls de sal edàfica del saladar i eixa és l'antesala que aprofiten les espècies halòfites per iniciar la progressiva germinació. De fet, l'aparició i la densitat de plantes varia d'un any a un altre en funció de la quantitat i moment de les pluges i, les llavors poden romandre latentment diversos anys en terra fins que la sequera es minimitzada. Eixe és el motiu pel qual, fins i tot, habiten plantes no halòfites en sòls salins (Ungar, 2001; Zhu, 2001).

1.3 Dinàmiques ecològiques d'ambients halòfils

Com succeeix en qualsevol paisatge, els ecosistemes halòfils constitueixen una xarxa d'associacions vegetals. Això sí, aquests no es comporten com a sistemes aïllats, absents d'interaccions externes, sinó que són part del conjunt de la vegetació d'un territori. Per això, cal considerar que independentment de les possibles diferències taxonòmiques de les comunitats halòfites respecte a altres formacions vegetals com les dunars per exemple, totes elles estan pròximes espacialment i posseeixen un paper fonamental quant a la successió dels estats seriatos de la vegetació (Alcaraz et al., 1989).

Les comunitats vegetals de saladers es distribueixen a mode d'anells concèntrics d'acord les inundacions estacionals i el gradient de salinitat edàfica. Les plantes crasses del gènere *Arthrocnemum*, *Halocnemum*, *Sarcocornia* o *Salicornia* conviuen exclusivament amb un elevat contingut de sal en el nucli central de la depressió (Pujol et al, 2001) i cap a la perifèria d'aquesta, on la sal tendeix a disminuir, es dona la instal·lació òptima d'aquelles comunitats menys tolerants com les herbàcies halo-higròfiles. En sòls més secs i absents de tolls s'estenen espècies de *Limonium*. En resum, la zonació característica del saladar semiàrid mediterrani (Álvarez et al., 2001) es plasma en la següent Fig. 2.



Fig. 2. Formacions representatives d'un saladar del Parc Natural del Fondo (Baix Vinalopó, Alacant) en gener de 2016. La disposició d'halòfites: *Mesembryanthemum* sp. (roig), *Halopeplis* sp. (verd grisenc) i *Salicornia* sp. (verd).

Els ambients halòfils són ecosistemes fràgils i com succeeix en els fragmentats i residuals marjaleres i cordons dunars, els saladars també

s'endinsen en una complexa interacció de factors biòtics i abiòtics. Per exemple, la desestabilització del règim hidrològic i la conseqüent alteració de les oscil·lacions de sal edàfica poden causar la regressió de les comunitats vegetals autòctones, endèmiques; les condicions òptimes de les quals es localitzen en els saladars.

Entre altres factors que posen en risc de forma alarmant aquests singulars espais es la instal·lació degradant de comunitats vegetals nitròfiles, derivades de l'ús excessiu de compostos nitrogenats en l'activitat agrícola. A més, el vulnerable marc es completa amb les ampliacions urbanístiques, la insuficient sensibilització mediambiental en el turisme de sol i platja o la introducció d'espècies invasores exòtiques (Al Hassan et al., 2016).

1.4 Plantes adaptades a l'estrès salí: la vida vegetal halòfila i propostes de classificació

Les espècies halòfites han de fer front fonamentalment a dos reptes. Per una banda, el desequilibri d'un component iònic com pot ser l'acumulació intracel·lular tòxica de clorur o sodi que inhibeix l'activitat proteica i per la qual cosa desestabilitza el creixement. A més, aquest excés de soluts afecta la nutrició mineral ja que perjudica la captació de cations de calci o potassi i promou l'estrès oxidatiu mitjançant la generació de "espècies reactives d'oxigen" (ROS). Per una altra banda, un perjudici indirecte però simultani a l'anterior desequilibri iònic és la disminució dels potencials osmòtics edàfics que comporta la dificultat d'absorbir aigua i per la qual cosa, un estrès hídric convertit en sequera fisiològica (Apel & Hirt, 2004; Flowers & Colmer, 2008).

Gran part de les plantes glicòfites o simplement "no halòfiles" són perjudicades quan l'entorn conté excés de soluts ja que son deshidrates fins morir. Realment, existeixen poques espècies vegetals halòfites capaces de suportar un contingut salí tòxic en el plasma cel·lular i no totes les plantes que habiten en sols salins són vertaderes halòfites. De fet,

alguns botànics han postulat la idea que aquestes últimes es troben relegades a saladers perquè són incapaces de competir amb altres espècies. I és que posseeixen particularitats que els permet subsistir exitosament en condicions adverses i evitar així la competència amb la vegetació glicofita durant la colonització del sòl (Alonso, 2000). A més, les espècies halòfites són englobades en un reduït grup de famílies: Aïzoàcies, Amarantàcies o Plumbaginàcies, entre altres. Encara que també hi ha plantes adaptades a la sal en altres famílies com les gramínies del gènere *Puccinellia*, *Lygeum* o les cariofil·làcies del gènere *Spergularia*, etc.

Dit això, allà pels anys 70, el naturalista Chapman postulà una classificació d'halòfites basada en el tipus de sòl i/o el creixement òptim de la planta (Monllor, 2012).

- Obligades: localitzades en sòls rics en sodi i no aconsegueixen desenvolupar-se si és baix.
- Facultatives: distribució màxima en sòls amb un alt contingut de sodi, però poden instal·lar-se també en sòls on no és present.
- Halotolerants: poden habitar en sòls amb alt contingut de sodi, encara que habitualment creixen en àrees que no contenen elevada quantitat d'aquest element.
- Glicòfites: espècies incapaces de germinar en sòls amb alt nivell de sodi.

Les halòfites colonitzen un mosaic d'hàbitats, des de penya-segats litorals fins a valls continentals, des de zones desèrtiques fins pantanoses, maresmes. Una heterogeneïtat espacial associada a una radiació taxonòmica (Flowers et al., 1986) i com no, a un diversificació de mecanismes d'adaptació per fer front a l'estrès salí. En les últimes dècades una multitud creixent d'equips de recerca s'han especialitzat en aquest camp, com les línies de treball posades en marxa per l'Institut d'Ús Sostenible d'Halòfits de la Universitat de Karachi (Khan & Gul, 2006; Manzoor et al., 2017). Per exemple, la simplificació del període de creixement o el retràs en processos com la germinació o la floració en halòfites són adaptacions fenològiques habituals en ambients àrids i/o desèrtics (Pasternak, 1987). Tot i que, cal indicar a trets generals, aquelles adaptacions (Basra and Basra, 1997; García, 2002) englobades en dos grups:

Morfològiques

- La disminució de la grandària foliar i densitat estomàtica limita la proporció transpiració/respiració.
- Predomini d'òrgans excretors de sal per tal de garantir l'autoprotecció de la planta: porus epidèrmics, tricomes, glàndules i càmeres localitzades en arrels, tiges o fulles. I és que els

diminuts cristalls de sal presents al llarg de la superfície foliar i del tall una vegada l'aigua s'ha evaporat, foren mobilitzats per transport intracel·lular fins ser expulsats.



- En medis rics en clorur, l'engrossiment del parènquima aquífer desencadena un port suculent i una turgència en vacúols que compensa les diferències de pressió osmòtica. L'exemplar cas del gènere *Salicornia* (Fig. 3) que significa literalment banyes salades, fa referència a un tret d'un grup de plantes amb tija carnosa i una menuda cornamenta certament ramificada.

Fig. 3. L'herba salada (gènere *Salicornia*) representa aquelles suculentas anuals capaces de viure en saladars litorals. No arriben als 30 cm d'alçada i les seues fulles semblen absents però en realitat, són molt reduïdes. Imatge publicada originalment per Jerry Kirkhart en Flickr (hipervincle: <https://goo.gl/6dKhde>) sota una llicència Creative Commons.

Fisiològiques

- Selectivitat iònica ja que les arrels d'halòfites són capaces d'excloure els ions de sodi i de clorur de l'absorció de nutrients. El mateix sistema radicular que a través d'una capa protectora externa i una membrana interna de ceres permet també la compartimentació de la sal edàfica.

- Responsable de l'augment del potencial osmòtic intracel·lular front a l'edàfic, l'osmoregulació facilita l'absorció, la pressió de turgència i la minimització de l'estrès osmòtic en la planta gràcies a l'acumulació d'osmolits (Grigore et al., 2011). Sintetitzats per la pròpia planta, actuen com a osmoprotectors; són compostos químics solubles en el plasma cel·lular, compatibles metabòlicament: polialcohols, sucres i aminoàcids.

De fet (Alcaraz, 2012) postulà una classificació d'halòfites d'acord els mecanismes d'adaptació descrits:

- Euhalòfites: habiten en sòls humits i salins. Gràcies a un teixit altament permeable, acumulen sals en el plasma cel·lular: *Arthrocnemum*, *Salicornia*, *Sarcocornia* o *Mesembryanthemum* (Oh et al., 2015).
- Glicohalòfites: realitzen una absorció selectiva respecte dels ions salins per tal d'afrontar la pressió osmòtica. Creixen en sòls menys salins, rics en hidrats de carboni: *Artemisia*, *Hordeum* o *Rhizophora*.

- Locahalòfites: les sals són emmagatzemades en reservoris, estructures especialitzades ja que així es regula la seua distribució en teixits: *Atriplex* o *Salsola*.

- Crinohalòfites: posseeixen glàndules (Fig. 4) o pèls vesiculars en la superfície foliar amb funció excretora. D'aquest mode, els permet créixer tant en sòls hipersalins com debilment salins: *Limonium*, *Tamarix* o *Frankenia*.

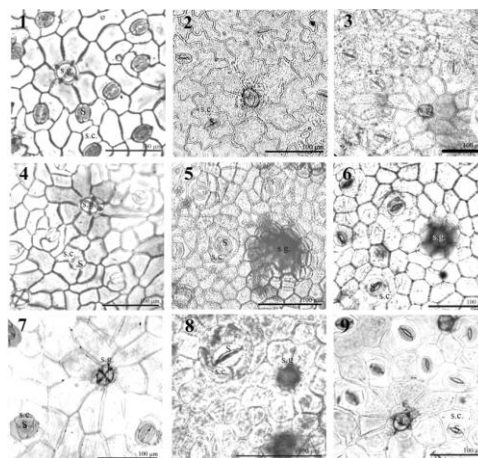


Fig. 4. Mosaic de mostres microscòpiques de cèl·lules epidermiques d'espècies de *Limonium*. Amb un calibratge de 100 µm, destaquen les formes globulars corresponents a les glàndules salines (s.g.) (Akhani et al., 2013).

1.5 Cicle vital d'un halòfit: etapa germinativa

Anuals o perennes, l'èxit de la colonització de les poblacions halòfites en climes mediterranis es deu a l'ajust de la resposta germinativa front a l'estrès salí. I és que la fase de germinació englobada en un cicle vital tan complex és la més determinant en ambients tan marcats per les condicions edàfiques. Un cas, l'estratègia reproductiva d'halòfites anuals de cicle bastant curt és caracteritzada per posseir una única ocasió de garantir la descendència per la qual cosa, la planta ha d'adaptar l'inici del seu cicle vital a les fluctuacions de la concentració de sal. És a dir, el comportament germinatiu de la planta es basa en la capacitat de romandre viable en forma de llavor durant perturbacions com els repunts màxims de concentració salina en el sòl durant l'estiu (Waisel, 1972; Donohue et al., 2010; Gul et al., 2013).

Com a regla general en el medi, a mesura que el contingut de sal edàfica augmenta, el percentatge germinatiu disminueix ja que la superació d'un llindar crític de tolerància a l'estrès osmòtic origina trastorns en l'embrió que desencadenen finalment el bloqueig metabòlic del procés de germinació. Gran part de les halòfites germinen millor en aigua dolça o a concentració mil·limolar (mM) inferior a 300. Tot i que, algunes crasses presenten durant la germinació una tolerància a salinitats superiors a la de l'aigua marina (600 – 700 mM); tolerància per damunt d'espècies secretores o herbàcies (Rivers & Weber, 1971; Khan & Gul, 1998; Khan et al., 2000).

Una vegada finalitzat el seu desenvolupament sobre la planta mare, la qual s'asseca a la fi de l'època estival, les llavors halòfiles disseminades pel saladar entren en un estat de repòs fins que es donen les condicions adequades per a la germinació. El inici d'aquesta depèn

d'un equilibri de tres factors (Khan & Gulzar, 2003): hores de llum (fotoperíode), rang tèrmic (termoperíode) i la salinitat edàfica. No obstant, cal considerar que la llavor és la unitat de dispersió de l'espècie, de manera que qualsevol mecanisme que retarda l'activació de la germinació tindrà la finalitat última de facilitar la supervivència de la futura plàntula, de l'espècie i no de la llavor. Per tant, existeix la dormició determinada per factors de la pròpia llavor, responsables de la inhibició de la germinació o per condicions ambientals desfavorables que originen un estat de quiescència.

En fisiologia vegetal, la pràctica totalitat d'espermatòfits posseeixen un rellotge biològic que els informa quan deuen activar si escau la dormició, la qual és una estratègia adaptativa per tal de fer front a pertorbacions ambientals difícils de superar que poden posar en risc la probabilitat de supervivència de la població (Baskin & Baskin, 1998; Baskin & Baskin, 2004). Durant el període de dormició, les llavors presenten un embrió i uns teixits de reserva molt deshidratats i amb una activitat metabòlica, consum energètic constant a un ritme mínim. D'aquest mode, si la llavor es sotmesa a condicions favorables de forma artificial i continua sense germinar, aleshores es diu que la llavor presenta dormició (Cao et al., 2014). Aquesta en les llavors pot ser interna motivada per característiques endògenes de l'embrió i no s'ha de confondre amb la dormició externa,

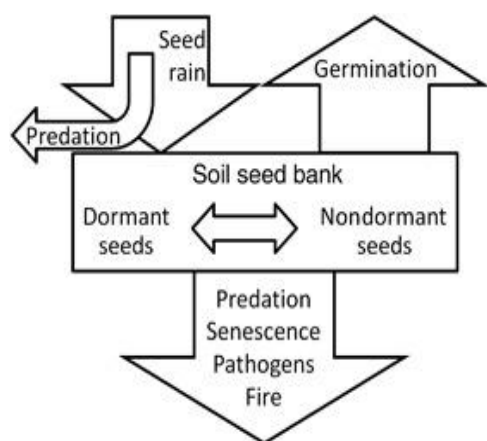


Fig. 5. Esquema extret de la recerca de (Walck et al., 2011). En ambients estressants, el banc de llavors proporciona el medi que evita l'extinció local de la població. A partir del reservori (rectangle), irradien fluxos de pèrdua i guany de llavors a causa de distints factors ambientals.

associada a la coberta de la llavor ja que el seu enduriment impedeix la possible entrada d'aigua i/o oxigen que reactivaria l'embrió. Si aquest marc fisiològic imprevisible entorn a la germinació s'allarga amb el pas del temps, la dormició induïda origina l'acumulació de llavors en el sòl del saladar i exposades a les variacions d'aquest. Es dona així la constitució d'un reservori, d'un banc de llavors; concepte ecològic relacionat amb les dinàmiques poblacionals, amb la colonització seqüencial de les comunitats vegetals (Venable, 2007; El-Keblawi, 2013; Saatkamp et al., 2014), com s'aprecia en la Fig. 5.

Per altra banda, la importància de la quiescència resideix en què és un estat de latència intermediari entre la possible dormició i l'activació de la germinació. En aquest cas,

mentre la llavor pateix una limitació de factors externs ni sortirà de la quiescència ni mostrarà el seu creixement potencial encara que aquesta estiga aparentment desperta. En aquest sentit, la situació d'inactivitat serà reversible quan es donen estímuls específics que permeten posar en marxa el procés de germinació (Bewley et al., 2013); per exemple, la variació de la temperatura, oxigenació del sòl, soterrament de les llavors o l'aparició d'una clariana, la presència de fongs, el pas pel tracte digestiu d'un rosegador o inclús l'efecte d'un incendi forestal. D'aquest mode, previ a l'origen d'arrels i fulles fotosintèticament actives, tenen lloc les etapes de la germinació, la duració de cadascuna dependrà de les propietats de la llavor (contingut en compostos hidratables, permeabilitat de les cobertes a l'aigua i l'oxigen). Plasmades en la posterior Fig. 6, ambdues primeres etapes són reversibles ja que una vegada la llavor entra en la tercera o bé origina una plàntula o bé mor:

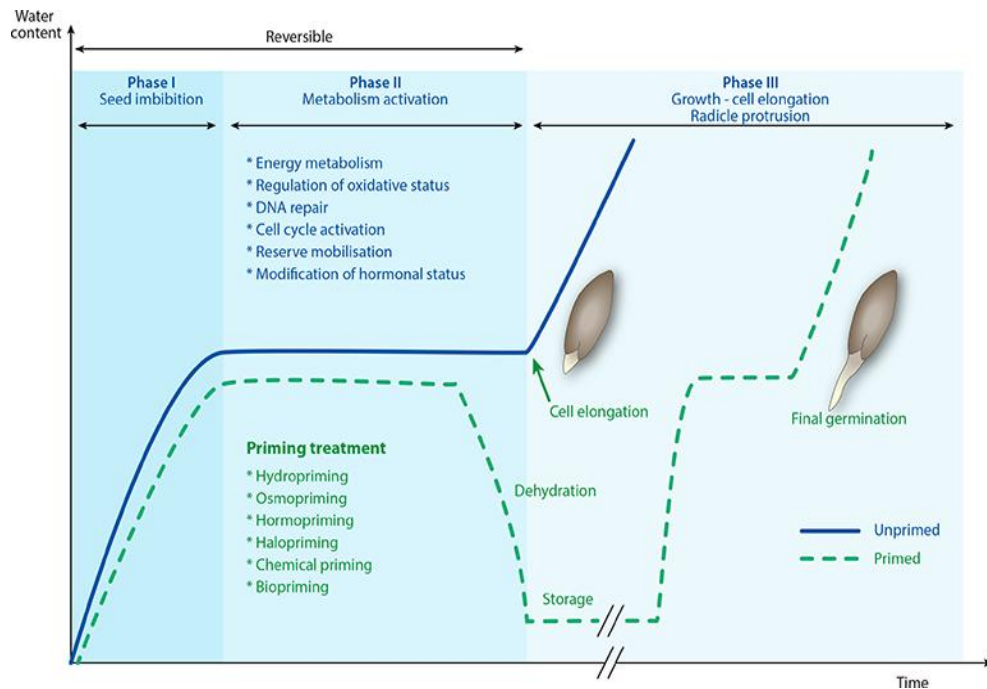


Fig. 6. Gràfica extreta de la recerca de (Lutts et al., 2016). Comparativa del patró trifàsic de germinació al llarg del temps d'una llavor sense tractar (línia blava contínua) respecte a una altra manipulada experimentalment (línia verda discontinua): *priming* d'estress hídric o salí, secat i emmagatzematge orientat a la conservació *ex situ*.

- **Fase I (Imbibició):** durant el període de quiescència, la llavor conté normalment un baix contingut hídric i quan té lloc l'entrada d'aigua des del medi exterior desencadena l'activació dels processos fisiològics i bioquímics que completen les següents fases. La duració de l'etapa d'hidratació dependrà de l'espècie. Això sí, cal considerar que la llavor pot bloquejar la germinació mitjançant la formació d'una capa mucilaginosa que dificulta l'entrada d'oxigen a causa d'un excés d'humitat edàfica o per contra, una hidratació

sobrada de la llavor pot provocar un trencament de l'eix embrionari que perjudica la germinació i el posterior establiment de la plàntula.

- Fase II (Germinació *sensu stricto*): una vegada la llavor s'ha hidratat adequadament es redueix considerable l'absorció i inclús es deté, tret característic d'aquesta etapa en què s'origina també una activació generalitzada del metabolisme d'aquelles llavors viables.

- Fase III (Creixement): paral·lelament a l'ascens de l'activitat bioquímica, es dona aquell canvi morfològic visible, principalment l'emergència de la radícula mitjançant el trencament de les cobertes seminals, pas motivat per la respiració i un nou impuls en l'absorció d'aigua. Aquelles llavors vives que han aconseguit arribar a la última fase, no retrocedeixen a etapes anteriors i en el cas que les condicions ambientals canvien i no permeten continuar el desenvolupament de la plàntula, la llavor morirà. Situació variable que dependrà de l'espècie i que implica una elevada despesa energètica pal·liada amb la mobilització de les reserves nutritives de la llavor.

1.6 Estratègies de preservació vegetal

Conservació *in situ*: ambients halòfils, hàbitats prioritaris

En biologia de la conservació, hi ha bàsicament dos espais d'actuació i si es tracta del lloc exacte, de l'hàbitat natural en què s'ubica l'organisme vegetal que es desitja conservar, això es el que s'anomena *in situ*.



Fig. 7. Aspecte d'un saladar del Parc Natural del Fondo (Baix Vinalopó, Alacant). L'herba gelada (*Mesembryanthemum nodiflorum* L.) constitueix els mantells arbustius verdosos de la imatge.

Ara per ara, gran part dels espais humits localitzats en la costa del sud-est ibèric com es el cas dels saladers del sud d'Alacant, presenten un estat natural crític a causa de diverses problemàtiques mediambientals, entre altres factors associats al canvi climàtic.

Tot i que, s'ha donat un colp de timó a l'incloure els ambients salins en la xarxa europea Natura 2000: Lloc d'Interès Comunitari (LIC), Zona d'Especial Conservació (ZEC) i Zona d'Especial Protecció per a les Aus (ZEPA). Determinades comunitats estepàries freqüents en saladers conformen un dels 18 hàbitats prioritaris valencians a causa del seu valor ecològic (Laguna, 2003) o es troben presents al llarg dels distints Parcs Naturals (Fig. 7) de

la nostra geografia. La figura legal de Parc Natural és una categoria de suma importància ja que són àrees naturals protegides, poc transformades per l'acció humana i representatives pels seus ecosistemes, per la singularitat de la flora, en aquest cas. De fet, més enllà del P.N. del Fondo, el Prat de Cabanes-Torreblanca, l'Albufera de València, la Marjal de Pego-Oliva, les Salines de Santa Pola o les Llacunes de La Mata-Torrevel·la posseeixen al voltant de llacunes salobres els millors redutes litorals de vegetació de saladar sec i humit del territori valencià i molts d'ells, de reconeixement internacional.

Des de la dècada dels 90, l'administració pública ha sigut precursora d'iniciatives de reforç com la delimitació de desenes de Microreserves; buc insígnia de la gestió mediambiental valenciana ja que és la figura legal dedicada exclusivament a la protecció i restauració floral (Fos et al., 2014). Es tracta de menudes parcel·les de menys de 20 Ha, en diverses ocasions incloses en altres figures de protecció; són refugi de flora rara, endèmica o amenaçada en distints ambients com les perimetrades en marjaleres: Marjal dels Moros (El Camp de Morvedre), Fontcalent (l'Alacantí) o La Mata (Baix Vinalopó).

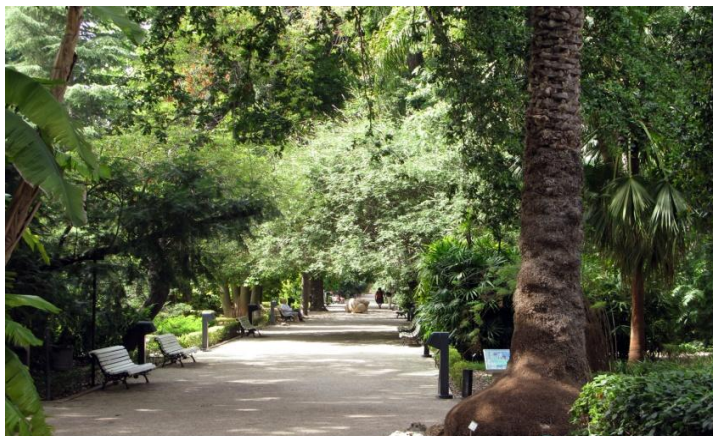
Menció especial tenen les actuacions realitzades pel Servei de Vida Silvestre de la Generalitat Valenciana entorn a espècies pertanyents al gènere *Limonium* que sols habiten en territori valencià i es troben en perill d'extinció. L'ensopeguera (*Limonium dufourii* Kuntze), Trenca l'olla de Santa Pola (*L. santapolense* Erben) o el limònim de La Marina (*L. rigualii* M. B. Crespo & Erben) han sigut sotmeses a protocols de germinació, propagacions *in vitro* necessàries per tal d'iniciar plans de reintroducció i reforçament poblacional en Microreserves de saladar (Estrelles et al. 2004). De fet, motivat per la desaparició imminent i/o inevitable del seu hàbitat natural a causa majoritàriament de la intensa pressió antròpica en la línia de costa, les espècies citades entre altres endèmiques iberollevantines són traslladades (processos de translocació) a ambients salins millor preservats.

Conservació *ex situ*: paper del Jardí Botànic i Banc de Germoplasma

L'anterior és la conservació ideal de la biodiversitat, tant de l'hàbitat com de les espècies que el conformen (European Commission, 2007), però és una meta difícil d'aconseguir en diverses ocasions i per tant, es complementada amb la conservació *ex situ*. Aquesta consisteix quan l'organisme o part d'ell es traslladat per a la seua preservació com ocorre en el present projecte. En aquest sentit, els jardins botànics (Fig. 8) són centres adequats per a portar a terme activitats *ex situ* (BGCI, 2012), on la fàcil multiplicació i domesticació vegetal, la preservació d'individus enlloc de poblacions, la impossibilitat de preservar la

total diversitat genètica d'una espècie o l'aprendre a cultivar plantes amenaçades són alguns dels factors característics a tindre en compte en conservació *ex situ*.

Fig. 8. Corredor central del Jardí Botànic de la Universitat de València. Transcorreguts més de 200 anys en la ubicació actual, el punt d'inflexió de la institució fou en la dècada dels 90, quan va tindre lloc una restauració integral.



En l'any 1991, el Jardí Botànic de la UV fundà el seu propi Banc de Germoplasma per tal d'impulsar la investigació i conservació de llavors d'espècies silvestres. Tot i que, preval l'estudi d'aquelles rares, endèmiques i amenaçades o d'altres d'interès sistemàtic corresponents a la flora del mediterrani occidental, en concret, la iberollevantina.

Les llavors i les espores són recol·lectades en el camp d'acord uns protocols consensuats internacionalment liderats per la European Native Seed Conservation Network (ENSCONET, 2009), els quals garanteixen la viabilitat de les mostres procedents d'individus i/o poblacions naturals variades i sense ser perjudicades. Aquestes mostres com les visibles en la Fig. 9, contenen material genètic i per tant deu ser preservat en òptimes condicions a 7% d'HR i -25°C per tal que romanen viables passats els segles. No obstant, la contribució del Banc de Germoplasma en la conservació *ex situ* va més enllà de generar



Fig. 9. Llavors encapsulades al Banc de Germoplasma de la UV. El gel de sílice groguenc de la càpsula actua com indicador de la humitat relativa de la mostra i així controlar prematures erosions genètiques de les llavors.

una reserva genètica, un gran rebost que actua com una espècie de còpia de seguretat. D'aquest mode, porten a terme un important treball d'investigació com l'estudi anatòmic i ecofisiològic de les llavors, processos d'envelliment i emmagatzematge, obtenció de protocols òptims de germinació de llavors i espores de pteridòfits o la multiplicació vegetal per tal d'efectuar reintroduccions en hàbitat (Estrelles et al., 2004).

1.7 Objectius del projecte

Objectiu general

- Avaluació de la resposta germinativa d'una espècie anual halòfita *Mesembryanthemum nodiflorum* L. a través de la selecció de requeriments específics i/o condicions òptimes de germinació.

Objectius específics

- Detecció de patrons de comportament i/o estratègies d'adaptació associades a la fase de germinació que afavoreixen la supervivència de l'espècie d'estudi. Marc estimat a través principalment del percentatge i el temps mitjà de germinació (TMG) i, la determinació del tipus de dormició.
- L'obtenció del protocol de germinació de *M. nodiflorum* L. ja que és considerada d'interès en les línies de treball d'ecofisiologia d'espècies vegetals sotmeses a estrès hídric i salí, així com en el funcionament dels saladers mediterranis i relacions de competitivitat entre plantes que els colonitzen.

2. MATERIALS I MÈTODES

2.1 Determinació de la zona d'estudi

El conveni de Ramsar (Davis et al., 1996) defineix el concepte d'espai humit com a àrees palustres composades per maresmes, fangars, pantans, torberes naturals o artificials, permanents o temporals i, on les aigües dolces, salobres o marines estan estancades. Encara freqüentment aïllades del mar a través de platges d'arena o còdols, són vulnerables ecosistemes a distintes pertorbacions que contrasten amb la seua perifèria. Precisament, en les comarques del sud d'Alacant destaca una representació de formacions quaternàries, endorreiques associades a les costes de restinga i albuferes com en el nostre cas, El Fondo (Crevillent - Elx). Encara que aquest Parc Natural és inclòs en la directiva europea LIC i ZEPA i, en el tractat de Ramsar i el Catàleg de Zones Humides de la Generalitat Valenciana; en la vora sud-est s'estén una partida municipal absent de protecció específica, el Canyissar d'Elx (Fig. 10). En aquest i pràcticament a nivell del mar, foren recollits exemplars del taxó d'estudi, l'herba gelada anual *Mesembryanthemum nodiflorum* L.



Fig. 10. Panoràmica del saladar d'estudi (Canyissar d'Elx, gener 2016), on destaquen les formacions arbustives d'halòfites i en concret les tonalitats rogenques corresponents a *Mesembryanthemum nodiflorum* L.

La importància ecològica dels ambients halòfils endèmics del Fondo es deu a tres factors. En primer lloc, la història tectònica involucrada en l'alçament de la serralada Bètica i el retrocés definitiu del Mediterrani a l'hora que les deposicions

fluvials de la desembocadura del Segura i Vinalopó originaven planures litorals. En segon lloc, l'elevada radiació i evaporació fomentà la precipitació salina, l'aflorament de sòls rics en guix. I per últim, a pesar de les limitacions edàfiques i hidrològiques, la històrica pressió agrícola i urbana ha modificat radicalment la fisonomia del Fondo (Canales et al., 2011). Els pantans de reg rodejats de basses circumdants d'aigües rases salobres permeten la identificació de tres ecosistemes en procés de regeneració: la marjalera, el canyissar i el saladar, entremesclats amb parcel·les de conreu.

2.2 Descripció botànica i ecològica de *M. nodiflorum* L.

El gènere *Mesembryanthemum* (Herre & Bolus, 1971) es reconegut per englobar plantes anuals o biennals, rarament perennes i que es troben postrades, crasses i recobertes superficialment de papil·les blanquinoses en les parts verdes. Les principals diferències anatòmiques de l'espècie d'estudi, *M. nodiflorum* L. respecte a la propera filogenèticament, *M. crystallinum* L., són la presència de fulles sèssils, semicilíndriques quasi tan amples com grosses i, estaminodis més curts que els tèpals.

Aprofundint en *M. nodiflorum* L., és una herbàcia anual, verda amb l'aparició de tonalitats rogenques en la primavera (Fig. 11). Tall adreçat amb ramificacions carneses i una distribució foliar que varia des de la base (oposada) fins als extrems superiors (alterna). Les flors d'1 cm de diàmetre són axil·lars, solitàries i hermafrodites. En les inflorescències destaca una multitud d'estams sorgits de l'estèril estaminodi i unes anteres grogues que contrasten amb uns pètals blancs groguencs més curts o lleugerament més llargs respecte a uns sèpals desiguals i crassos (Castroviejo et al., 1986-2012).

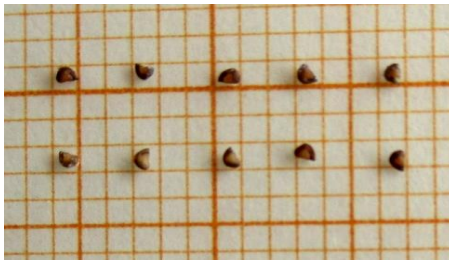


Fig. 11. Superior, una desena de llavors representatives de *M. nodiflorum* L. i a la dreta, exemplar madur florit en el PN. del Fondo (Canyissar d'Elx).



En les cinc cavitats internes que conformen la càpsula (fruit sec i dehiscent) es localitzen les llavors (Guttermann, 1980; Guttermann, 1994). Com s'aprecien en la Fig. 11, presenten secció triangular amb coloració marró rogenca i coberta berrugosa. En resum, *M. nodiflorum* L. (Valdés et al., 1987):

- Nom comú: herba gelada en valencià i en castellà, algazul o cosco.
- Família: Aizoaceae.
- Forma i cicle vital: segons la classificació de Raunkjaer, aspecte teròfit. Associada a climes àrids, completa el seu cicle en primavera (estació favorable) i, roman en forma de llavor durant l'estiu ja que el repòs vegetatiu absolut és avantatjós prèviament a la dispersió i exposició a possibles temporals tardorencs, hivernals.
- Grandària de la planta: erecta 25 - 30 cm com a màxim.

- **Ecologia:** ruderal halonitròfil tant en substrats arenosos com pedregosos de saladers litorals o d'interior (0 - 600 m.).
- **Fenologia:** el període de màxima floració és entre febrer i juliol.
- **Distribució:** Espècie cosmopolita, original dels deserts sud-africans i localitzada en la conca mediterrània, arxipèlags macaronèsics; a més, en ambients desèrtics de la regió arabosahariana i siberiana.
- **Categoria IUCN*:** Quant a grau de conservació, diagnosticada com a preocupació menor i en determinades regions és considerada introduïda, invasora.
- **Etimologia:** Breynus, creador del nom del gènere, suposà que *Mesembryanthemum* es deu a què les flors s'obrin al migdia (gr. *mesēmbria* f. = migdia; gr. *ánthemon* n. = flor). Pel que fa a *nodiflorum*, referència a què les flors sorgeixen dels nodes.

2.3 Processament de les mostres vegetals

Recol·lecció i ingrés del material en el Banc de Germoplasma

Tenint en compte el cicle biològic de *M. nodiflorum* L., la fi de l'estació estival coincideix amb la màxima síntesi de llavors abans de dispersar-se pel sòl, moment en què es dugué a terme una recollida representativa de mates seques. Tallades amb precaució, fixant-se en el grau de maduresa i la consistència seminal i, el rebuig d'aquelles llavors amb signes de desgast procedents del sòl. Durant el trasllat, s'usaren bosses de paper per tal de preservar un ambient amb una temperatura i humitat adequada i així, no provocar alteracions de la viabilitat seminal (ENSCONET, 2009).

Una vegada en les instàncies del Banc, les mates farcides per milers de llavors es deixaren assecar uns dies en un ambient ventilat i controlat (20°C, 40% d'HR), esteses sobre safates. Paral·lelament, sota un codi numèric atorgat per la normativa del Banc (en el nostre cas, 27B2015), es reomplí en la base de dades la fitxa tècnica referent al taxó i la població d'origen: nom de l'espècie i la seua família, dates de recol·lecció i d'entrada al Banc, nom del recol·lector, procedència del mostreig (localitat, altitud i coordenades geogràfiques); com també, els mètodes empleats en la neteja de llavors i el grau qualitatiu d'aquesta.

Neteja i extracció del germoplasma

L'adequada manipulació de les llavors és determinant ja que influirà en la viabilitat d'aquestes i per tant, en l'eficàcia de la conservació a llarg termini. Primerament, abans de prescindir dels talls sobrants de les mates, foren sacsejades i així es desprendrien les llavors de les capsules obertes. Cal considerar que la diminuta grandària de la llavor fou sinònim d'optimitzar una neteja seriada, altament minuciosa (Fig. 12):

- Mortor i làmina, esborrador de goma: abrasió i trossejament de càpsules (fruits).
- Tamisadora (*Vibro Orto Alresa*): la barreja de llavors i restes de càpsules fou filtrada selectivament d'acord la grandària a través de la llum dels tamisos (1 i 1,5 mm).
- Relliscat sobre safata metàl·lica: separació d'impureses amb bufits suaus respecte a les llavors mentre que aquestes rodolen pendent avall.
- Ventilador (*Selecta*): el refinament de l'anterior pas culminà amb el descens de les llavors per un conducte zig-zag (Fig. 12) fins ambdós depòsits, els quals separen les impureses més lleugeres o llavors buides respecte de les de bon estat.



Fig. 12: Conjunt d'utensilis usats. En primer pla: esborradors de goma, pinzells, morter de fusta i, plaques, embut i tub per tal de reagrupar les llavors; i en segon pla, columna de tamisos sobre vòrtex i safates (imatge esquerra). La clau del ventilador és la regulació de la intensitat del flux d'aire durant la caiguda de les llavors al llarg de la rampa (imatge dreta).

Caracterització morfològica de la llavor

Mitjançant el programa biomètric Image J (Rassband, 1997-2012) i sota un calibratge d'1 mm, s'obtingueren les dimensions, és a dir, l'amplitud i la longitud mitjana d'un centenar de llavors de la planta d'estudi. Tanmateix, s'estimà el pes (g) d'un centenar de llavors amb una balança de precisió de laboratori.

2.4 Protocols de germinació

Consideracions inicials

En el conjunt d'assajos experimentals fou necessari l'ús de plaques de Petri amb agar al 0,6%, el qual actuava com a substrat i on les llavors foren sembrades equidistants sense ser soterrades, asfixiades amb les pinces. Identificades amb el codi de l'espècie, data de sembra i condició de germinació predeterminada, s'usaren generalment per a cada prova 4 rèpliques (plaques de Petri) de 25 llavors. Quant al seguiment de la incubació en càmeres, les proves de germinació es mantingueren fins que no s'observaren noves germinacions. Per tant, depenent de l'assaig la duració total fou de 15, 30 o 60 dies i els recomptes es

realitzaren diàriament durant els primers cinc dies, després es realitzaren cada 2-3 dies i finalment, setmanalment fins confirmar la finalització del procés germinatiu. Dit això, foren considerats durant el recompte una sèrie d'estats fisiològics seminals, determinats per la International Seed Testing Association (ISTA, 2006) amb la finalitat de facilitar una major comprensió entorn als percentatges finals de germinació.

- Germinades: l'elongació emergent de la radícula en un dels extrems de la llavor indicà el desenvolupament *a priori* d'una plàntula sota condicions adequades.
- Embegudes: llavors fresques, hidratades i viables però que al final de l'assaig foren incapaces de donar lloc a una plàntula.
- No embegudes: llavors que no patiren una suficient hidratació a causa de la possessió de teguments durs i impermeables.
- Malformades: llavors germinades però amb un deficient, debilitat creixement de la plàntula: òrgans atrofiats, anòmals i/o danyats. A l'igual que les germinades, foren apartades a la perifèria de la placa per tal de deixar espai a aquelles futures germinacions.
- Podrides: llavors infectades i que en molts casos, moren. Per tant, fou necessari un breu rentat amb lleixiu, secar i ressembla de les llavors ja que així es minimitzava la contaminació fúngica de la resta de la rèplica.
- Buides i/o trencades: falses llavors (sense embrió intern) filtrades de la prèvia neteja. Solien ser detectades durant la disposició inicial en la rèplica o durant la comprovació final del recompte de germinació. En ambdós casos, foren descomptades del número total de llavors sembrades en rèplica (valor n).

Com veurem, en gran part dels assajos i previ a la sembra en agar, es mesurà l'efectivitat de l'activació de la germinació a través de la imbibició de les llavors durant 24 h. en un tub d'Eppendorf, el qual contenia una solució de gibberel·lines, GA3 (1000 ppm*). D'aquest mode, de les 8 rèpliques pertanyents a una condició, 4 d'elles patiren tractament hormonal.

Barreig inicial de temperatures

Una vegada fet el procés de neteja, tingué lloc un test preliminar (control) per tal de definir a trets generals la resposta germinativa de *Mesembryanthemum nodiflorum* L. i valorar la validesa, la viabilitat de les llavors recol·lectades amb una hipotètica taxa de germinació superior al 85% (ENSCONET, 2009). D'aquest mode, cada interval tèrmic (15, 20/10, 20, 25/15 i 25°C), contenia dos grups de quatre rèpliques: 12/12h llum/fosc i 24h fosc permanent. Foren descartades temperatures d'incubació a 5, 10 i 15/5°C ja que en el PN. del Fondo, en l'hàbitat natural de la planta no es solen donar-se temperatures tan baixes.

Pretractament I | Estratificació freda a 5°C i càlida a 20/35 – 45°C

Per una banda, l'estratificació freda consisteix en dipositar durant quatre mesos a 5°C quatre grups (corresponents a les temperatures d'incubació de les sèmres: 15, 20/10, 25/10 i 25/15°C) compostats de huit rèpliques: quatre amb absència d'imbibició amb GA3 i quatre amb aquesta. Cal considerar que durant el període d'estratificació freda es vigila setmanalment puntuals germinacions.

Per l'altra banda, l'estratificació càlida contempla nombrosos tests, per la qual cosa sols s'usà una única temperatura de germinació, 25/10°C. L'elecció ajustada d'aquest règim tèrmic alternant amb una amplitud tèrmica de 15°C, s'ha basat en les observacions de camp (arbustos ben desenvolupats de *M. nodiflorum* L. de dos o tres mesos en gener) i les condicions climàtiques donades en la població natural de la zona de recol·lecció (aquells dies més plujosos de la tardor amb un rang mitjà de 24/14°C), paràmetres facilitats per l'Institut Valencià d'Investigacions Agràries (IVIA).

Endinsant-se en aquesta estratificació, es bifurcava en dos línies experimentals de dos a dotze setmanes (Taula 1), on les llavors s'incorporen en incubadora a 20/35°C i a 100% d'HR (medi humit, d'agar) i en estufa de secat (*Raypa Incuterm*) a 45°C i a 60% d'HR.

PAS I Tipus d'estratificació: càlida		PAS II	PAS III	PAS IV: Seguint de la germinació a 25/10°C durant 15 dies
Procedència de les llavors	Duració (nº setmanes)	GA3 (1000 ppm*, 24 h)	Sembra de les rèpliques	
Embegudes a 35/20°C: (9 condicions i 36 plaques en total)	2	Ø GA3	Les 36 rèpliques de distinta procedència foren ressebrades denou en agar.	
	4	Ø GA3 / GA3		
	6	Ø GA3		
	8	Ø GA3 / GA3		
	10	Ø GA3		
	12	Ø GA3 / GA3		
60% a 45°C: (9 sobrets de 100 llavors)	2	Ø GA3	Les 100 llavors de cada sobret foren sembrades en 4 rèpliques d'agar.	
	4	Ø GA3 / GA3		
	6	Ø GA3		
	8	Ø GA3 / GA3		
	10	Ø GA3		
	12	Ø GA3 / GA3		

Taula 1. Cronograma metodològic de l'estratificació càlida. Considerar que una vegada finalitzat el període d'estratificació a 35/20°C, fou reajustat el valor n* d'aquelles rèpliques en què hi havien llavors podrides o germinades absents de dormició. La ressebra de llavors en noves plaques de Petri (PAS III) fou motivat per l'assecat de l'agar.

En el cas de l'estratificació a 45°C, nou sobrets de paper degudament identificats amb el n° de setmanes d'estratificació i compostats de cent llavors. Aquests foren col·locats en un recipient hermètic de vindre sense contacte directe amb una solució de 60 g de clorur de liti (LiCl) a concentració 7,1 M, la qual determina una humitat relativa entorn al 60% en l'interior del recipient, atmosfera a la qual s'equilibren les llavors (Gold & Hay, 2008).

Pretractament II | Tipus d'halopriming: Gradient salí i cicles d'hidratació

L'halopriming és una tècnica d'acondiciament osmòtic i iònic de la llavor (Afzal et al., 2008; Ghulam et al., 2016) que permet estudiar la resposta germinativa i la viabilitat seminal front a distintes dissolucions salines (NaCl *Scharlau* al 99,8%). Aquestes originen un estrès salí que desapareix quan les llavors pateixen una decantació (simulació del rentat de la pluja en l'hàbitat natural). Dit això, preparació de nou grups de cent llavors per a cada mes d'halopriming a 25°C. D'eixos nou: un fou el control (aigua destil·lada enlloc de sal), quatre per cada una de les solucions salines que conformen el barreig: 500 mM, 600 mM, 700 mM i 800 mM. I per últim, quatre grups més corresponents a idèntiques solucions salines per tal de ser embeguts en GA3 posteriorment a l'halopriming, com s'observa recopilat en la Taula 2.

PAS I Tipus d'halopriming: Gradient salí				PAS II	Pas III: Seguiment de la germinació a 25/10°C durant 15 dies
Condicions del pretractament				Rentat de la sal de les llavors dels tubs a la fi de cada mes.	
Incubació a 25°C	Nº tubs. (1 tub: 4 rèpliques)	Duració (nº dies)	Concentració salina (mM)		
	1 Control		Control		
	4 Sal	30	500, 600, 700 i 800		
	4 Sal + GA3		500, 600, 700 i 800		
	1 Control		Control		
	4 Sal	60	500, 600, 700 i 800		
	4 Sal + GA3		500, 600, 700 i 800		
	1 Control		Control		
	4 Sal	90	500, 600, 700 i 800		
	4 Sal + GA3		500, 600, 700 i 800		

Taula 2. Cronograma metodològic de l'halopriming associat al barreig salí.

En segon lloc, l'altra vessant de l'halopriming correspongué als cicles d'hidratació i deshidratació, tècnica reconeguda en el camp de ecologia vegetal amb el nom de *Seed hardening* o *Recovery* (Khan & Ungar, 1997; Munns, 2002). Un centenar de llavors foren depositades sobre paper de filtre en una placa de Petri i banyades amb unes gotes de solució salina a 500 mM (representa la fase d'hidratació, el període humit). Transcorreguts uns quatre dies, es donà l'evaporació a T°C ambient amb la precipitació dels cristalls de sal (fase de secat) i, el llavat de les llavors si el següent pas era la sembra en agar i incubació a 25/10°C. Si no, addició denou de solució salina i així s'iniciava un nou cicle d'hidratació del conjunt de llavors, repetit fins obtenir un primer, cinquè i desè cicle. Tanmateix, tindre en compte que els tres cicles foren realitzats paral·lelament dues vegades més: tractament hormonal (GA3 24 h) posterior a l'halopriming i previ a la sembra i, un control (fases d'hidratació amb aigua destil·lada).

Pretractament III | Xoc tèrmic a 70, 80 i 100°C

Aquesta tècnica simula els pics màxims de temperatura que suporten els bancs de llavors del sòl en hàbitats de bioclima mediterrani xèric o desèrtic (Daws et al., 2007) durant dies estivals d'ona de calor o incendis forestals, encara que poc habituals en saladars a causa de l'escassa biomassa. En aquest sentit, per tal de trencar la dormició i examinar la tolerància de la llavor, s'optà pel possible col·lapse de la testa seminal mitjançant l'exposició de la llavor a breus períodes de deshidratació extrema: 100, 80 i 70 ± 2°C durant 10' i en el cas d'aquesta última temperatura durant 5, 30 i 40'.

Ubicació d'un grup de quatre tubs de cristall corresponents a una temperatura i temps en



els pous dels blocs de l'escalfador Tembloc (*Selecta*) com es mostra en la Fig. 13. Passat un quart d'hora, amb un embut foren distribuïdes equitativament cent llavors ja que es deu garantir que aquestes estiguen en contacte directe amb la paret escalfada del tub. El xoc finalitzà amb el temperat de les llavors en una placa de Petri durant 90', prèviament a la sembra en agar i incubació a 25/10°C.

Fig. 13: Els tubs deuen estar aïllats amb tacs per preservar la temperatura abans d'afegir les llavors i l'ús d'un termòmetre per contrastar la temperatura aconseguida en el Tembloc.

Pretractament IV | Escarificació

L'escarificació permet analitzar l'efecte del deteriorament de la coberta de la llavor i la conseqüent imbibició de l'embrió en la resposta germinativa. Aquest desgast, debilitament

de les cobertes provocat en el laboratori podria ser causat en el banc natural de llavors per factors ambientals com el removiment i trepig del sòl, l'efecte abrasiu de la càrrega granulomètrica transportades per les ratxes de vent litorals o inclús el pas de la llavor pel tracte digestiu d'un rosegador.

Tipus d'escarificació: catalogació preliminar

A banda del control amb llavors intactes, les escarificacions dutes a terme foren de dos tipus: física i química. A trets generals, la física o mecànica consisteix en què mentre fou immobilitzada amb una pinça, cadascuna de les llavors d'un grup de cent patí amb un bisturí un raspat o tall superficial en la coberta. Efectuats en l'extrem oposat d'on emergeix la radícula (regió micropilar) amb la finalitat de minimitzar el dany en aquesta o la possible malformació de la plàntula germinada.

L'escarificació química deriva del remull corrosiu de cent llavors amb àcid sulfúric (H_2SO_4) en un vas de precipitats durant un i dos minuts com a màxim ja que calia evitar la posada en risc de la viabilitat de les llavors. L'àcid i altres components inhibitoris de la coberta causants de la dormició foren eliminats amb tres rentats de les llavors sota l'aixeta. Després, aquestes s'assecaren amb paper de filtre i, se'ls retirà fàcil i opcionalment la coberta amb bisturí. Tant el grup procedent de l'escarificació mecànica o química a 1 i 2' com el control foren sembrats en 4 rèpliques de 25 llavors i incubades en cambra a 25/10°C.

Escarificació química associada a barreig de temperatures

Les llavors pretractades amb l'escarificació àcida d'1' foren distribuïdes en distintes cambres d'incubació a 10, 15, 20, 20/10, 25, 25/15, 30 i 35°C. El motiu fou estudiar la variació de la velocitat de germinació de llavors escarificades i sembrades a dites temperatures.

Escarificació química associada a l'halopriming

Partint de dos grups de cent llavors procedents d'un escarificat químic, mentre un d'ells fou dipositat posteriorment en una solució salina de 500 mM durant 48 h. i denou rentat per decantació, l'altre grup de llavors fou el control (remull amb aigua destil·lada) durant idèntica duració. Després ambdós grups foren sembrats en 4 rèpliques de 25 llavors i incubats a 25/10°C. Tècnica que ens permet detectar la possible vigor potencial de l'espècie respecte a l'estrès salí.

Estratificació càlida a 45°C (30 i 60% d'HR) i posterior escarificació

L'última aplicació de l'escarificació consisteix en col·locar en l'estufa de secat (*Raypa Incuterm*) a 45°C tres sobrets de cent llavors a 30% d'HR i tres més a 60% d'HR com s'ha

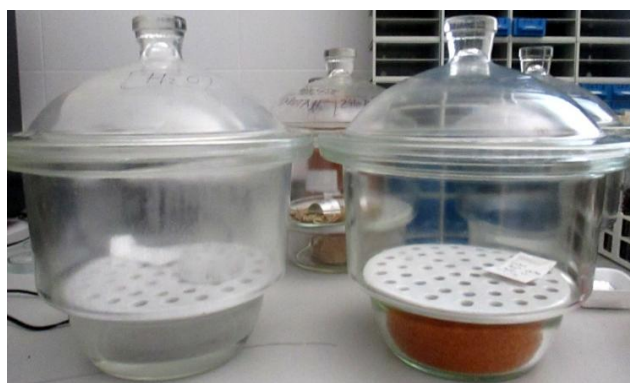
descriu anteriorment, tant per a quatre com per a huit mesos. El pas entre ambdós períodes i, la sembra i incubació de les 4 rèpliques, fou sotmetre un sobret a una escarificació mecànica, un segon a una química i un últim (control) fou directament sembrat. Això ens permet analitzar la tolerància a l'estrès tèrmic i el ritme d'envelliment de la llavor front a les fluctuacions d'humitat relativa imposades.

2.5 Estudis de permeabilitat de la coberta seminal

Descrits els assajos de germinació encarregats del trencament de la hipotètica dormició en *Mesembryanthemum nodiflorum* L., l'eficàcia i la idoneïtat d'aquests en la resposta germinativa fou justificat en últim lloc amb l'examinació del paper de la coberta seminal com a possible barrera física en l'intercanvi de gasos i aigua durant el patró trifàsic de germinació. D'aquest mode, estimació de la mitjana del contingut hídric percentual i la seua desviació estàndard, d.s. (ISTA, 1999) respecte al pes en fresc (BF) i pes en sec (BS) de la llavor (μg) a distintes condicions mitjançant la microbalança *Orion Cahn C-33*. A més, aquesta metodologia fou posada en pràctica en un ambient aïllat al 40% d'HR per tal de minimitzar possibles anomalies en les fluctuacions del contingut hídric seminal.

En primer lloc, elaboràrem manualment 80 menuts pouets de paper l'alumini amb un doblec per tal de ser transportats amb pinces i retolats numèricament ja que a cada una de les condicions experimentals descrites a continuació li corresponia un grup de 20 pouets. Una vegada estimat el pes dels pouets buits (BB), s'iniciaren les quatre línies de treball intercalades amb la determinació del BF* i BS*.

- Secat a 7% d'HR: un sobret de 20 llavors dipositat durant 24 h (duració equivalent a la primera germinació en condicions òptimes) en un dessecador hermètic, el qual recrea un ambient a dita HR a causa del gel de sílice granulat acumulat en la base del recipient (Fig. 14).



- Hidratació al 100% d'HR: un segon sobret de 20 llavors ubicat en un humidificador segellat (Fig. 14), sense contacte directe amb el volum d'aigua present en la base del recipient.

- Escarificació física: una tercera vintena de llavors foren tallades en un

Fig. 14. Durant 24 hores, el dessecador (recipient dret) contenia el sobret control i, l'humidificador (esquerra) posseïa un altre sobret de llavors i a més, la placa procedent de l'escarificació física.

dels seus extrems i dipositades en una placa de Petri oberta en el mateix humidificador durant 24 h (Fig. 14).

- Escarificació química: una última vintena sotmeses durant 1' al remull d'àcid sulfúric i consecutius rentats durant una hora per tal de reblanir les testes.

Vuitanta llavors en total procedents dels anteriors ambients foren assignades en els 4 grups de 20 pouets enumerats per tal d'obtenir la BF*. Després tots ells s'agruparen en 8 vasos metàl·lics i adreçats per tal d'evitar llavors extraviades com s'observa en la Fig. 15. A la mateixa figura, s'aprecia la preparació de la fase de dessecat dels vasos amb els pouets en l'estufa (Homelab).



Fig. 15: A l'esquerra, designació llavor - pouet per tal d'obtenir la BF* i distribució en vasos. A la dreta, el dessecat de les vuitanta llavors a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ durant 17 ± 1 h (ISTA, 1999).

Finalment, transcorregut el període d'extrema deshidratació i prèviament a l'estimació escalonada del BS*, trasllat denou dels vuit vasos al dessecador de 7% d'HR amb la finalitat de refredar progressivament les llavors fins als 20°C durant mínim 30' i així evitar la reabsorció d'aigua de l'ambient a causa del brusc canvi tèrmic ja que podia ocasionar l'alteració del pes i en última instància, el contingut hídric de la llavor a comparar.

Per últim, ja acabat el mètode, cal considerar que els 80 pouets romandrien en el dessecador per si calia contrastar denou aquells valors BS* erronis, pertanyents a cada condició. A més, el conjunt de llavors elegides devien estar aparentment en bon estat i absents de restes de brutícia adherides a les cobertes per tal d'evitar la pèrdua de precisió de les mesures BF* i BS*.

2.6 Anàlisi paramètric i estadístic.

Paràmetres d'estudi

La resposta germinativa de *Mesembryanthemum nodiflorum* L. s'avaluà a través dels següents indicadors, els quals s'han tingut en compte d'acord els criteris de cada pretractament a examinar. Tanmateix, els valors percentuals del contingut hídric,

germinació i temps mitjà d'aquesta (TMG) foren estimats amb les seues respectives desviacions típiques (d.s.).

- Percentatge de germinació: fou calculat per a cada rèplica i el percentatge final de l'assaig realitzat a partir de la mitjana de totes les rèpliques sotmeses a idèntiques condicions de germinació (Eq. 1). Mesura que estima la idoneïtat del test preliminar, estratificació, halopríming, xoc tèrmic i escarificació.

$$\% \text{ de germinació} = \frac{\text{llavors germinades}}{\text{total llavors} - \text{llavors buides}} * 100$$

(1)

- Temps mitjà de germinació (TMG): s'obté determinant el número de llavors germinades diàriament i amb la consideració del total de llavors germinades (Brenchley and Probert, 1998). En l'Eq. 2, la $n1$ és el número de llavors germinades en el dia, $d1$ és el número de dies des del començament del seguiment de la germinació i N és el número total de llavors germinades a la fi de l'assaig. El TMG o la velocitat de germinació fou obtinguda en aquells pretractaments on la significança podia ser major: xoc tèrmic, aplicacions de l'escarificació i en aquelles condicions de germinació òptimes dels pretractaments restants.

$$\text{TMG} = \frac{n1 \cdot d1}{N}$$

(2)

A causa de raonaments teòrics, els valors d' $1/\text{TMG}$ (dies-1) respecte a les temperatures constants del barreig de l'escarificació química foren necessaris per tal de constituir les possibles rectes de regressió i l'equació de la pendent a través de l'ajust per mínims quadrats disponible en Microsoft Office Excel 2010. Dit açò, aquesta inversa del TMG ens facilita contextualitzar l'estratègia de colonització de la planta en l'hàbitat natural d'acord la interpretació de les pendents resultants (Noe and Zedler, 2000; Trudgill et al., 2005).

- Temperatura base (T_b): per davall de la qual no hi ha germinació a causa del fred (Eq. 3). Com ocorre amb els tres indicadors posteriors, les seues estimacions procedeixen dels càlculs duts a terme en les rectes de regressió constituïdes ($y = ax + b$). És a dir, la temperatura base, l'òptima i la màxima conformen el rang òptim germinatiu de *M. nodiflorum* L.

$$T_b = \frac{b}{a}$$

(3)

- Temperatura òptima (T_o): correspon amb el pic màxim de la 1/TMG i s'obtingué amb l'aïllament de la incògnita en la igualtat d'ambdues equacions de la recta de 1r grau.
- Temperatura màxima (T_m): on té lloc el col·lapse de la fase de creixement de la plàntula a elevades temperatures. La formula usada és idèntica a la T_b .
- Temps tèrmic (S): confereix la idoneïtat fisiològica de l'espècie d'acord amb l'ambient tèrmic al que s'adapta. Aquest requeriment tèrmic permet analitzar el comportament germinatiu d'una espècie per tal de concloure el seu grau de competitivitat front a altres espècies de l'hàbitat natural. S'expressa en °C/dia (Eq. 4).

$$S = \frac{1}{a}$$

(4)

- Percentatge de contingut hídric: on BB fa referència al pes (μg) del pouet buit, BF és el pes (μg) del pouet amb la llavor previ al dessecat en estufa i BS és el pes (μg) posterior a dit dessecat de la llavor (Eq. 5). Com s'ha descrit, fou aplicat expressament en l'estudi de la permeabilitat de la coberta seminal (ISTA, 1999).

$$(BF - BS) = \frac{100}{(BF - BB)}$$

(5)

Eines estadístiques

Malgrat el limitat número de rèpliques per assaig de germinació (mostra seminal inferior a 5) s'usà el test paramètric ANOVA (Khan and Rayner, 2003) per tal de processar el conjunt de dades. És a dir, una anàlisi de la variància multifactorial univariant mitjançant el programa informàtic IBM SPSS Statistics 22, el qual permeté demostrar si la influència dels factors és significativa en el percentatge i el temps mitjà de germinació.

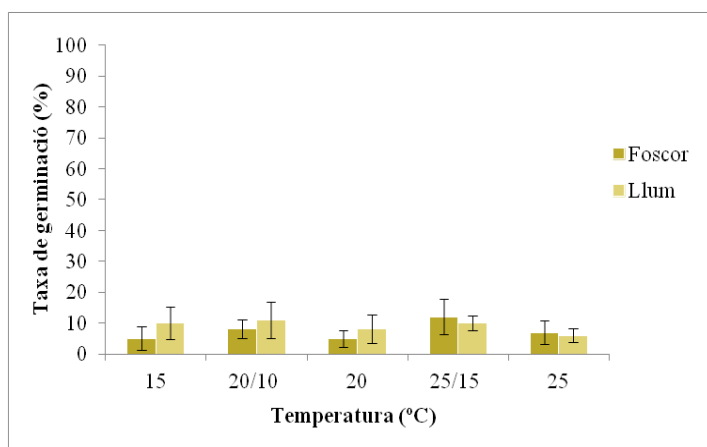
El test Post-hoc de Turkey determinà la possible presència de diferències significatives ($P < 0,05$) entre les mitjanes i grups homogenis d'interès corresponents als tractaments pregerminatius com a les condicions de treball de l'examinació de la permeabilitat seminal.

3. RESULTATS

3.1 Caracterització morfològica de la llavor

Com s'ha comentat anteriorment, l'eina informàtica Image J (Rassband, 1997-2012) ha facilitat una grandària seminal notablement menuda: longitud (0,8-1 mm) i amplitud (0,5-0'6 mm); i el pes de cent llavors entorn a 0,012 g. Cal considerar que el tamany pot tindre conseqüències determinants en la dispersió, viabilitat, germinació, supervivència i habilitat competitiva de les plàntules en l'hàbitat natural.

3.2 Barreig inicial de temperatures i de llum



De la Fig. 16 i la Taula 3 es desprèn la poca estimulació del factor il·luminació i temperatura en els percentatges de germinació, inferiors al 10% en pràcticament la seua totalitat.

Fig. 16. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) associat al barreig de temperatures del test preliminar.

Taula 3. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) associat al barreig de temperatures d'incubació, cadascuna de les quals conté una sembra en permanent foscor i l'altra alternant en llum.

Il·luminació	15°C	20/10°C	20°C	25/15°C	25°C
Foscor	5 \pm 3,8	8 \pm 3	5 \pm 2,8	12 \pm 5,7	7 \pm 3,8
Llum	10 \pm 5,2	11 \pm 6	8 \pm 4,6	10 \pm 2,3	6 \pm 2,3

Aquesta resposta germinativa de *M. nodiflorum* L. mínima fou rebutjada ja que la majoria de llavors no germinades presentaven aparentment un bon estat (embrions sencers), és a dir, posseïen una viabilitat potencial. En aquest sentit, la poca idoneïtat d'aquest barreig inicial amb la sembra directa de llavors fresques obrí un nou escenari de treball. Es sentencià que les llavors possiblement patien dormició (Baskin & Baskin, 1998; Baskin & Baskin 2004) i sols germinaven aquelles poques absents d'ella. D'aquest mode, si la manipulació indirecta de l'embrió (dormició fisiològica) no es traduïa en una germinació notable, el mecanisme de dormició residia en la coberta (dormició física).

En el següent apartat, exposarem de menor a major èxit els distints tractaments pregerminatius efectuats respecte fonamentalment a la temperatura d'incubació, els quals avaluen el comportament germinatiu de *M. nodiflorum* L. i el mode d'interrompre de forma efectiva la dormició associada a l'embrió o a la testa seminal.

3.3 Tractaments pregerminatius

Pretractament I | Estratificació freda a 5°C (100% d'HR) i càlida a 20/35°C (100% d'HR) – 45°C (60% d'HR) amb ús de GA3

Després del període d'estratificació freda a 5°C, a 20/10°C s'aconseguí el percentatge de germinació màxim, parlem d'un $20,4 \pm 3$ i 19 ± 11 amb imbibició de gibberel·lines (GA3, 24 h) i absència d'aquest, respectivament. Per tant, el tractament hormonal no fou un agent actiu en la germinació

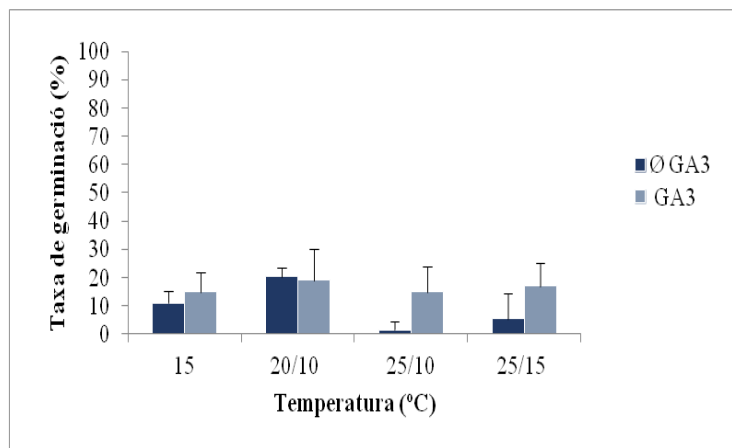


Fig. 17. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) a distintes temperatures d'incubació corresponents als quatre mesos d'estratificació freda a 5°C en medi humit i amb aplicació opcional d'imbibició de GA3.

tant a 20/10 °C com a 15°C al contrari del què ocorregué a 25/10 i 25/15°C, com s'aprecia en la Fig. 17. En ambdós últims règims tèrmics, l'acció de GA3 prèvia a la sembra permeté una germinació entorn al 15% front al 5% sense aquesta. A més, el període fred de 4 mesos no influencià positivament en la resposta germinativa.

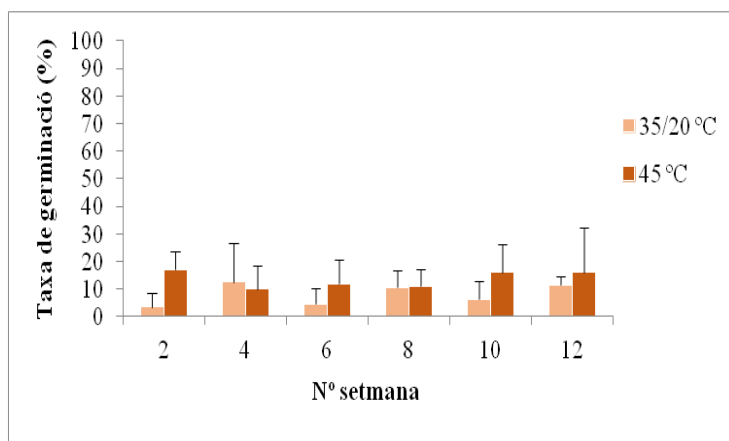


Fig. 18. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) a 25/10°C provinent dels períodes d'estratificació càlida a 35/20°C (100% d'HR) i 45°C (60% d'HR).

arribaren al 20% a 45°C. Quant a les llavors embegudes amb GA3 (Fig. 19, Taula 4), s'obtingué un $24 \pm 7,3$ pertanyent a l'octava setmana encara que l'efecte hormonal en la germinació associada a la quarta, octava o dotzena setmana a 20/35 o 45°C es considerà rebutjable.

Quant a l'estratificació càlida, exceptuant quasi idèntics percentatges de germinació en la quarta i octava setmana com observem en la Fig. 18, la resposta germinativa fou més activa en l'estratificació a 45°C respecte al rang altern de 20/35°C (Fig. 18, Taula 4); tot i que, els valors de germinació no

Taula 4. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) a 25/10°C provinent de les setmanes d'estratificació càlida a 35/20°C (100% d'HR) i 45°C (60% d'HR).

Temperatura (°C)	Set 2	Set 4	Set 6	Set 8	Set 10	Set 12
35/20	3,60 \pm 4,8	12,5 \pm 14,4	4,7 \pm 5,4	10,7 \pm 6	6,4 \pm 6,7	11,4 \pm 3,2
45	17 \pm 6,8	10 \pm 8,3	12 \pm 8,6	11 \pm 6	16 \pm 10,3	16 \pm 16,3

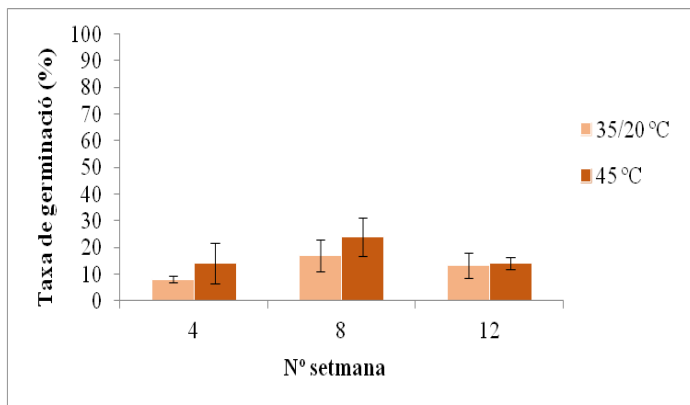


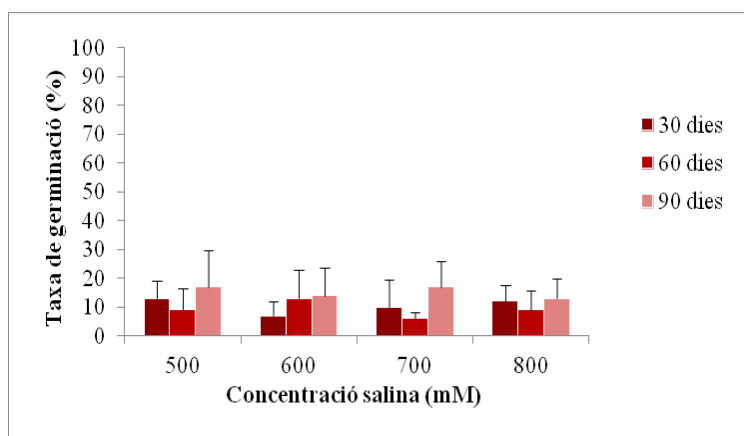
Fig. 19. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) a 25/10°C provinent de la quarta, octava i dotzena setmana d'estratificació càlida a 35/20°C (100% d'HR) i 45°C (60% d'HR). Períodes associats amb l'ús de GA3.

Pretractament II | Tipus d'halopriming: Gradient salí i cicles d'hidratació

La primera vessant experimental de l'halopriming fou el gradient creixent de concentracions salines a 25°C durant tres mesos consecutius; cadascun d'aquests períodes tingué el seu control amb un percentatge germinatiu que rondà entorn el 10%: 8 \pm 3,3 (30 dies), 11 \pm 5 (60 dies) i 9 \pm 2 (90 dies).

En absència (Fig. 20, Taula 5) o presència (Fig. 21, Taula 6) de tractament hormonal posterior al remull salí i independent del mes, s'observaren diferències mínimes en el percentatge de germinació a 25/10°C. De fet, el llindar del 10% fou la tònica general en el gradient salí encara que el tercer mes a 500 mM i 700 mM sense ús de GA3 s'acostà al 20% (Fig. 20, Taula 5).

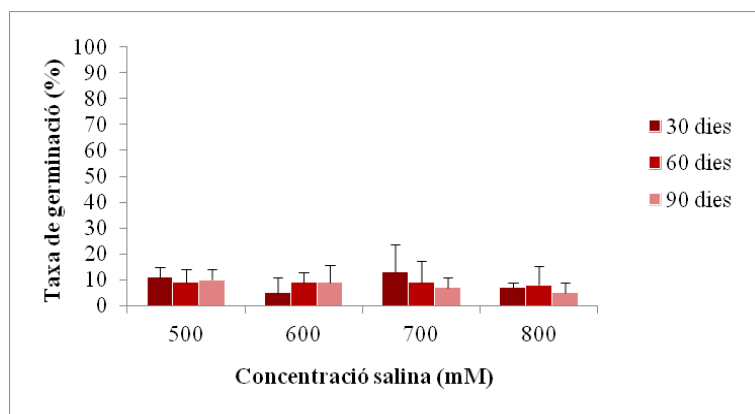
Fig. 20. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) a 25/10°C procedent dels períodes mensuals de barreig salí (mM) a 25°C i sense aplicació posterior de GA3.



Taula 5. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) a 25/10°C procedent dels períodes mensuals de barreig salí (mM) a 25°C i sense aplicació posterior de GA3.

Concentració salina (mM)	30 dies	60 dies	90 dies
500	13 \pm 6	9 \pm 7,6	17 \pm 12,8
600	7 \pm 5	13 \pm 10	14 \pm 9,5
700	10 \pm 9,5	6 \pm 2,3	17 \pm 8,9
800	12 \pm 5,7	9 \pm 6,8	13 \pm 6,8

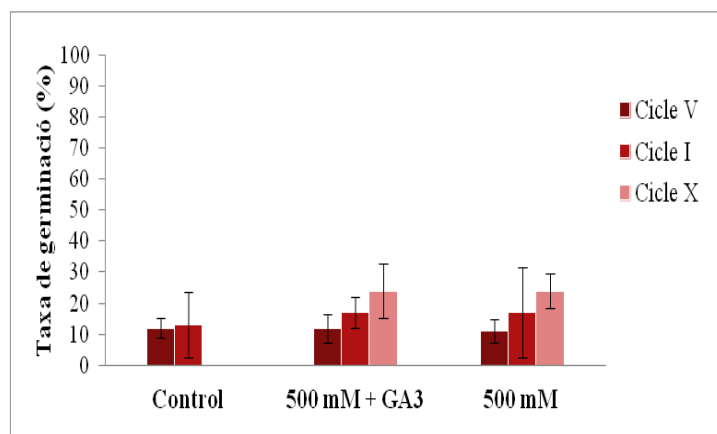
Fig. 21. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) a 25/10°C procedent dels períodes mensuals de barreig salí (mM) a 25°C i amb aplicació posterior de GA3.



Taula 6. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) a 25/10°C procedent dels períodes mensuals de barreig salí (mM) a 25°C i amb aplicació posterior de GA3.

Concentració salina (mM)	30 dies	60 dies	90 dies
500	11 ± 3,8	9 ± 5	10 ± 4
600	5 ± 6	9 ± 3,8	9 ± 6,8
700	13 ± 10,5	9 ± 8,2	7 ± 3,8
800	7 ± 2	8 ± 7,3	5 ± 3,8

En la segona aplicació de l'halopriming, la sèrie de cicles d'hidratació (concentració salina a 500 mM) i deshidratació (secat a temperatura ambient, 20°C) aconseguí el pic màxim de germinació en el desè cicle amb un 24%, indiferentment de la imbibició de GA3 com es visualitza en la Fig. 22. Poca estimulació del tractament hormonal idèntica en el primer i cinquè cicle amb un 17% i 12% respectivament. A més, el control del desè cicle



d'hidratació ens permeté puntualitzar una nul·la germinació front al 13% en el primer i cinquè cicle.

Fig. 22. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) a 25/10°C procedent del 1r, 5è i 10è cicle d'hidratació a 500 mM i secat a 20°C; sotmesos a GA3 opcionalment.

Pretractament III | Xoc tèrmic a 70, 80 i 100 °C

El dessecat a 70, 80 i 100°C durant 10' originà una relació inversament proporcional entre la temperatura i la mitjana de germinació amb un màxim del 30% a 70°C (Fig. 23). No obstant, coincidí amb una germinació notablement lenta a 12 dies (Fig. 24) i amb unes desviacions singularment elevades a causa de la variabilitat de l'efecte de l'ambient tòrrid

en les llavors a l'interior dels tubs. En canvi, el TMG disminuï a 5,6 i 2 dies, a 80 (16%) i 100°C (1%) respectivament.

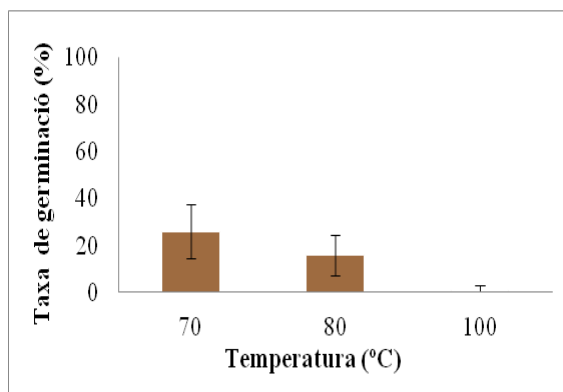


Fig. 23. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) a 25/10°C corresponent al xoc tèrmic de 10' a 70, 80 i 100°C.

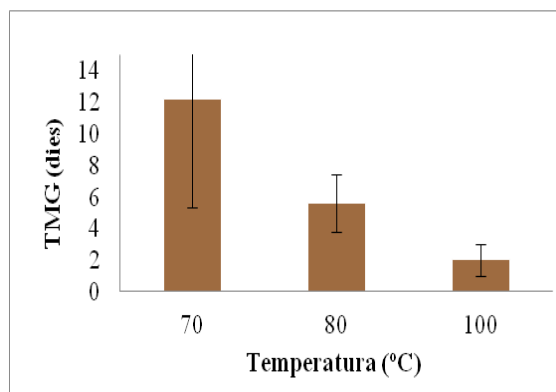


Fig. 24. Temps mitjà de germinació expressat en dies (\pm d.s.) a 25/10°C corresponent al xoc tèrmic de 10' a 70, 80 i 100°C.

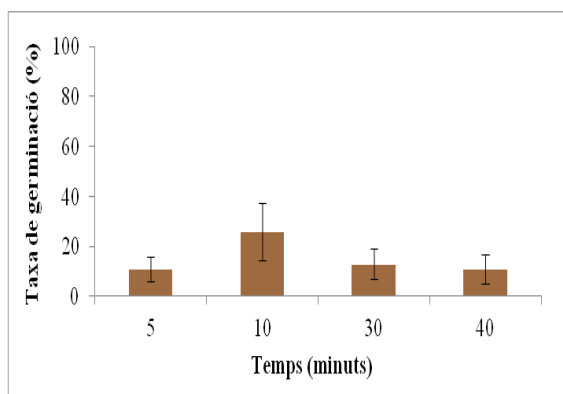


Fig. 25. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) a 25/10°C corresponent al xoc tèrmic de 70°C a 5, 10, 30 i 40'.

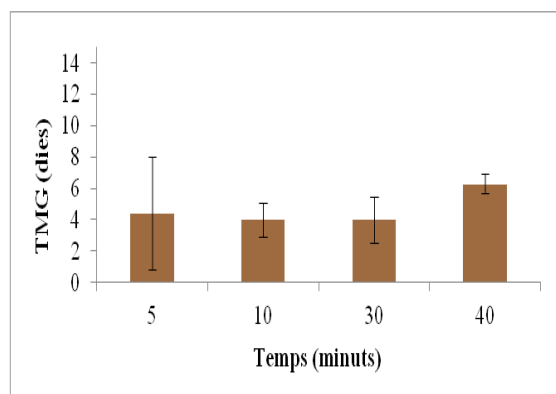


Fig. 26. Temps mitjà de germinació (\pm d.s.) a 25/10°C corresponent al xoc tèrmic de 70°C a 5, 10, 30 i 40'.

Considerant que la temperatura favorable del xoc fou a 70°C, s'optà per aplicar altres períodes. Dit açò, la germinació disminuï aproxim. un 14% a 5, 30 i 40' front als 10' (Fig. 25) i la velocitat de germinació tendí a disminuir de quatre a sis dies si el xoc es retardava fins als 40' com es plasma en la Fig. 26.

Pretractament IV | Escarificació

Tipus d'escarificació: catalogació preliminar

En primer lloc, el tipus d'escarificació de la coberta seminal més efectiu de tots els aplicats fou la química amb un ritme de germinació del 85%, destacat en la Fig. 27 i que disminuï al 63% si l'abrasió àcida fou prolongada 1' més. A diferència del control amb tant sols el 10%, l'escarificació mecànica augmentà fins al 60% acompanyat d'una desviació estàndard del 30 possiblement motivat per la variabilitat del tall en la llavor.

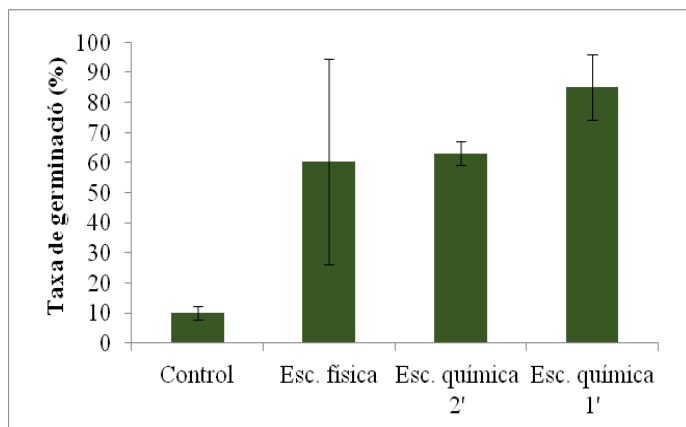


Fig. 27. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) a 25/10°C en funció dels distints tipus d'escarificació empleats.

Escarificació química (H_2SO_4) associada a barreig de temperatures

L'anterior escarificació química a 1' es contrastà mitjançant un barreig de temperatures front al percentatge de germinació i el TMG (Taula 7). En aquest sentit, sols els rangs extrems del barreig (10, 30 i 35°C) presentaren una germinació inferior al 80%; disminució més acusada en ambdós superiors, els quals coincidien amb els TMG més elevats (Fig. 28). En aquest pretractament s'assoleixen a rangs alternants els resultats de germinació de major èxit, superiors al 95% en 72 h d'incubació com es recull en la Fig. 29 i en la Taula 7. Encara que destaca el rang tèrmic de 20/10 i 25/15°C, no hi han diferències estadísticament significatives amb els percentatges restants, a excepció de 30 i 35°C (Fig. 29).

Taula 7. Percentatge i temps mitjà de germinació (\pm d.s.) corresponents al barreig tèrmic de l'escarificació química a un 1'.

Temperatura (°C)	Germinació (%)	TMG (dies)
10	84 \pm 8,6	8,9 \pm 2,1
15	99 \pm 2	4,1 \pm 0,4
20	95 \pm 3,8	3 \pm 0,3
20/10	98 \pm 2,3	3 \pm 0,2
25	89 \pm 8,3	2,4 \pm 0,1
25/15	96 \pm 0	3 \pm 0,5
30	31 \pm 6	3,8 \pm 0,8
35	58 \pm 10,6	4,3 \pm 1,3

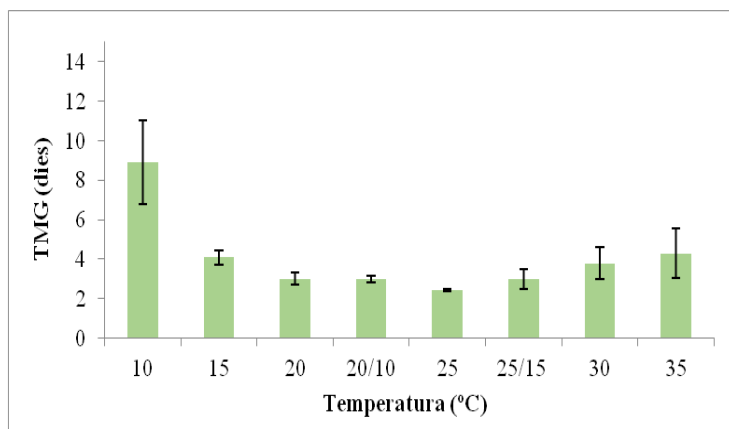


Fig. 28. Temps mitjà de germinació (\pm d.s.) corresponent al barreig tèrmic. Escarificació química a un 1'.

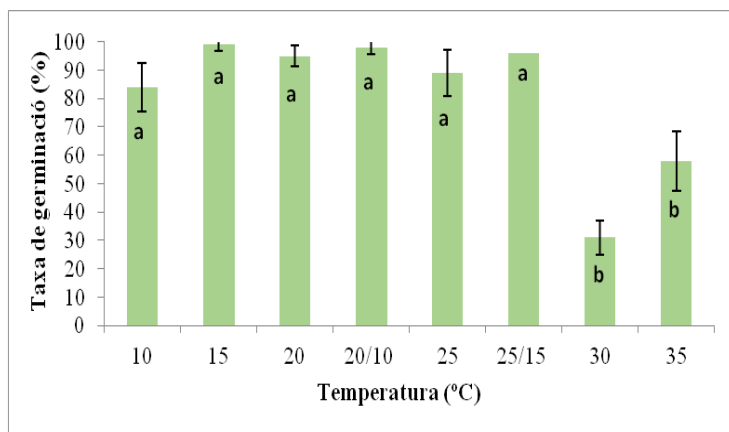


Fig. 29. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) corresponent al barreig tèrmic. Escarificació química a un 1'.

A partir de l'anterior escarificació química (H_2SO_4 , 1'), la inversa del temps mitjà de germinació ($1/TMG$, dies $^{-1}$) respecte a les temperatures constants permeté el càlcul d'ambdues rectes de regressió (Fig. 30) i així, la temperatura base (T_b , 3,7°C) fins la temperatura òptima (T_o , 24,2°C). Des d'aquest pic màxim, la germinació decreixé a 30 i 35°C fins una temperatura màxima (T_m) extrapolada de 46,7°C. Quant al valor S, temps tèrmic, es situà entorn a 50'5°C/dia.

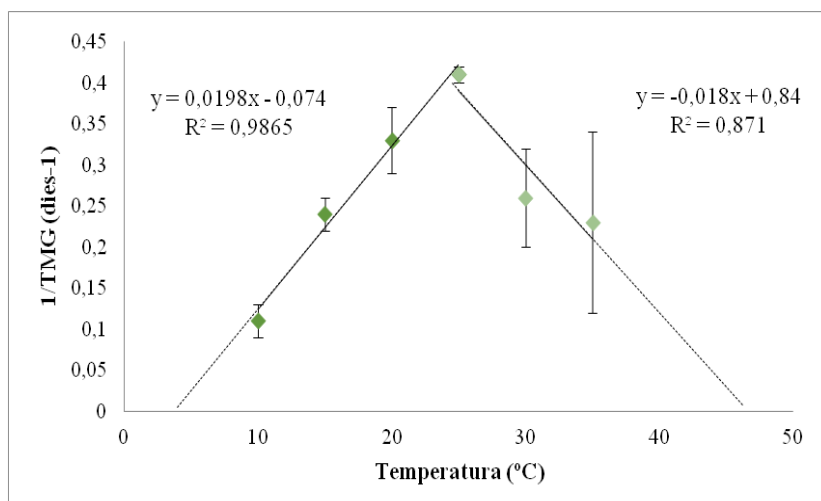


Fig. 30. Inversa del temps mitjà de germinació (\pm d.s.) i equacions de la pendent procedents del barreig tèrmic de l'escarificació química.

Estratificació càlida a 45°C (30 i 60% d'HR) i posterior escarificació

En aquesta ocasió, l'escarificació química i física fou complementada amb una prèvia estratificació càlida a 45°C durant quatre i huit mesos (Taula 8). La germinació percentual d'ambdues escarificacions disminuïa si es duplicava el grau d'humitat relativa (Fig. 31); de fet, cal subratllar que la germinació fou nul·la als huit mesos d'estratificació a 60% d'HR. A banda, a mesura que s'incrementava la duració de l'estratificació fins als 8 mesos, la velocitat de germinació es retardava dia i mig més com s'aprecia en el bloc del 30% d'HR de la Fig. 32.

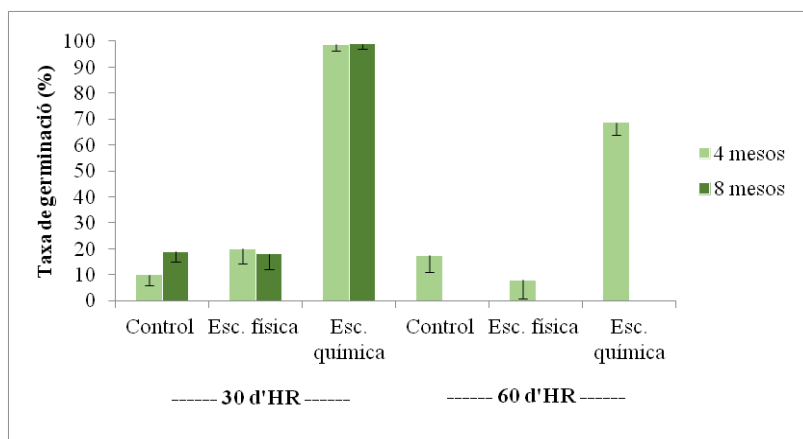


Fig. 31. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) a 25/10°C després del pretractament compost per l'estratificació càlida a 45°C (30 i 60% d'HR) durant 4 i 8 mesos i, posterior control i escarificació física o química a 1'.

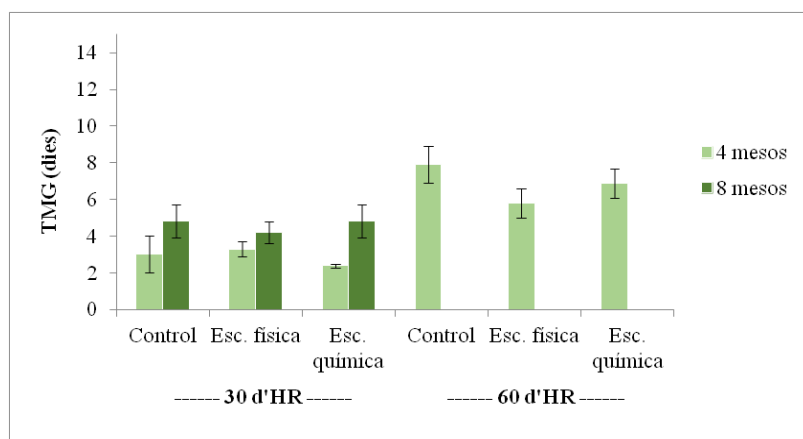


Fig. 32. Temps mitjà de germinació expressat en dies (\pm d.s.) a 25/10°C després del pretractament compost per l'estratificació càlida a 45°C (30 i 60% d'HR) durant 4 i 8 mesos i, posterior control i escarificació física o química a 1'.

Taula 8. Percentatge i temps mitjà de germinació expressat en dies (\pm s.d.) a 25/10°C després del pretractament compost per l'estratificació càlida a 45°C (30 i 60% d'HR) durant 4 i 8 mesos i, posterior control, escarificació física o química a 1'.

Est. càlida + Escarificació			Control (Ø escarificació)		Escarificació física		Escarificació química	
			%	TMG	%	TMG	%	TMG
45 °C	30%	4	10 ± 4,1	3 ± 1	20 ± 5,7	3,3 ± 0,4	98,8 ± 2,5	2,4 ± 0,1
		8	19 ± 3,8	4,8 ± 0,9	18 ± 6	4,2 ± 0,6	99 ± 2	4,8 ± 0,9
	60%	4	17,5 ± 6,5	7,9 ± 1	8 ± 7,3	5,8 ± 0,8	68,8 ± 4,8	6,9 ± 0,8
		8	-	-	-	-	-	-

Comparativa de la resposta germinativa: control i escarificació química

El barreig preliminar de temperatures d'incubació constants o alternants mostrat en el segon apartat dels resultats es recuperat per tal de comparar el percentatge i la velocitat d'aquelles llavors intactes (control) front a les escarificades amb 1' d'àcid sulfúric (Taula 9; Taula 10). Dit això, al llarg dels rangs tèrmics s'aprecià un salt del 10 al 90% de germinació (Fig. 33) a favor de l'escarificació a la vegada que el seu TMG es redueix entorn a tres dies, el qual és més acusat en el límit superior del barreig tèrmic (Fig. 34).

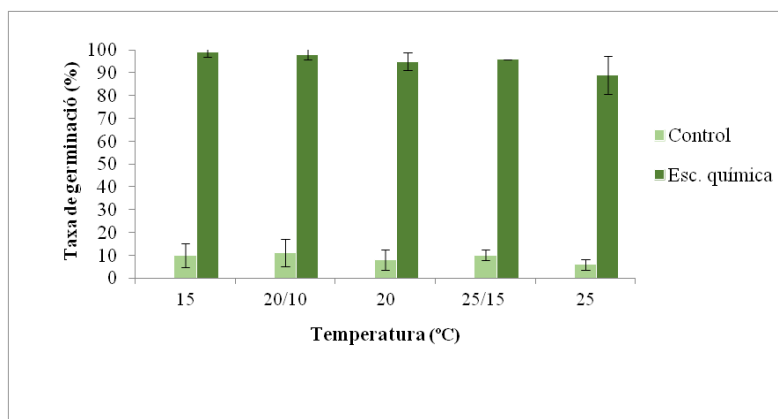


Fig. 33. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) associat al barreig de temperatures d'acord la manipulació de la coberta seminal.

Taula 9. Percentatge de germinació final (\pm d.s.) associat al barreig de temperatures (°C) segons el grau d'alteració de la coberta.

Estat llavor	15	20/10	20	25/15	25
Control	10 \pm 5,2	11 \pm 6	8 \pm 4,6	10 \pm 2,3	6 \pm 2,3
Escarificat químic	99 \pm 2	98 \pm 2,3	95 \pm 3,8	96 \pm 0	89 \pm 8,25

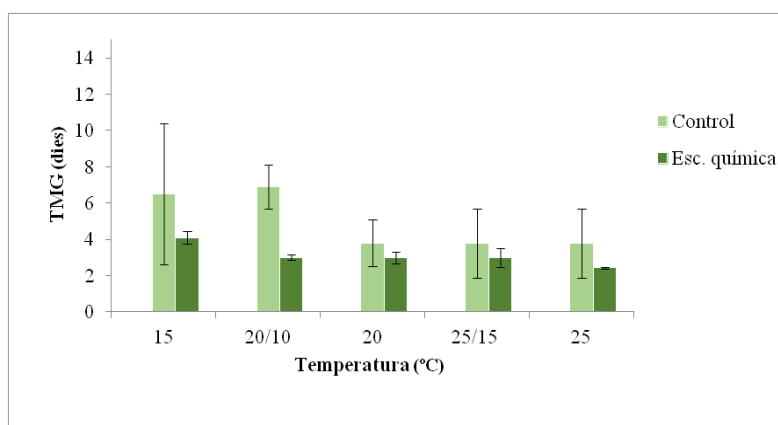


Fig. 34. Temps mitjà de germinació expressat en dies (\pm d.s.) associat al barreig de temperatures d'acord la manipulació de la coberta seminal.

Taula 10. Temps mitjà de germinació expressat en dies (\pm d.s.) associat al barreig de temperatures (°C) segons el grau d'alteració de la coberta.

Estat llavor	15	20/10	20	25/15	25
Control	6,5 \pm 3,9	6,9 \pm 1,2	3,8 \pm 1,3	3,8 \pm 1,9	3,8 \pm 1,9
Escarificat químic	4,1 \pm 0,4	3 \pm 0,2	3 \pm 0,3	3 \pm 0,5	2,4 \pm 0,1

3.4 Visió global de la resposta germinativa derivada dels pretractaments

Fent un repàs de les respostes germinatives (Fig. 35, Taula 11) estimades en l'anterior secció, valorem el protocol que inclou l'escarificació química com a òptim ja que s'aproxima al 100%. Circumstància traduïda amb un ràpid creixement de les plàntules d'estudi (Fig. 37) i per l'augment de la velocitat de germinació (Fig. 36) a tan sols tres dies front als més de cinc predominants en gran part dels pretractaments germinatius restants.

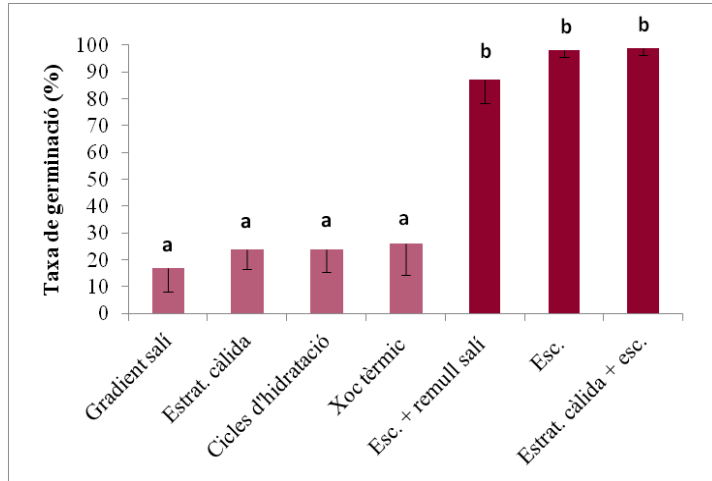


Fig. 35. Mostra representativa dels pretractaments responsables de la resposta germinativa de *M. nodiflorum* L., estimats a través del percentatge de germinació final (\pm d.s.) a 25/10°C. Els majors percentatges presentats en coloració més obscura.

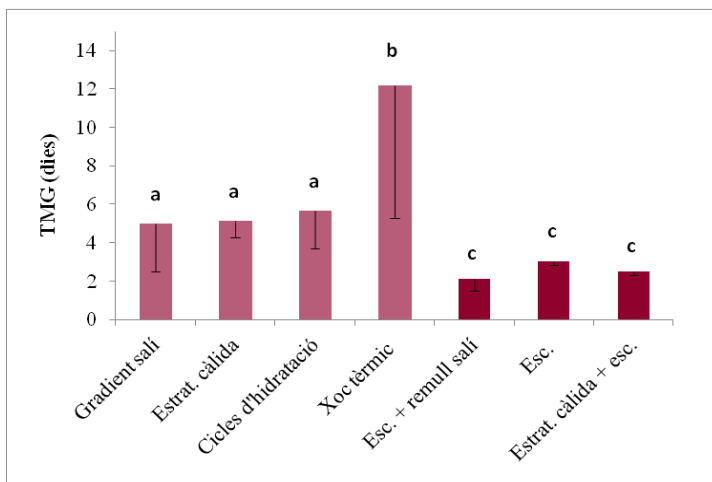


Fig. 36. Mostra representativa dels pretractaments responsables de la resposta germinativa de *M. nodiflorum* L., estimats a través del temps mitjà de germinació (\pm d.s.) a 25/10°C. Els menors TMG presentats en coloració més obscura.

Taula 11. Percentatge i TMG (\pm s.d.) a 25/10°C d'aquells pretractaments que intervenien en la modulació de la resposta germinativa de *M. nodiflorum* L. Els valors més elevats són destacats en blau obscur.

Protocol de germinació	%	TMG (dies)
Halopriming (gradient salí): 90 dies a 25°C i a 700 mM.	17 \pm 8,9	5 \pm 2,5
Estratificació càlida: octava setmana a 45°C i 60% d'HR.	24 \pm 7,3	5,1 \pm 0,8
Halopriming (desè cicle d'hidratació a 500 mM).	24 \pm 8,6	5,7 \pm 2
Xoc tèrmic de 10' a 70°C.	26 \pm 11,5	12,2 \pm 6,9
Escarificació química d'1' i 48h en solució salina a 500 mM.	87 \pm 8,5	2,1 \pm 0,6
Escarificació química d'1' a 20/10°C	98 \pm 2,3	3 \pm 0,2
Estratificació càlida a 4 mesos (45°C, 30% HR) i escarificació química d'1'.	98,8 \pm 2,5	2,5 \pm 0,2

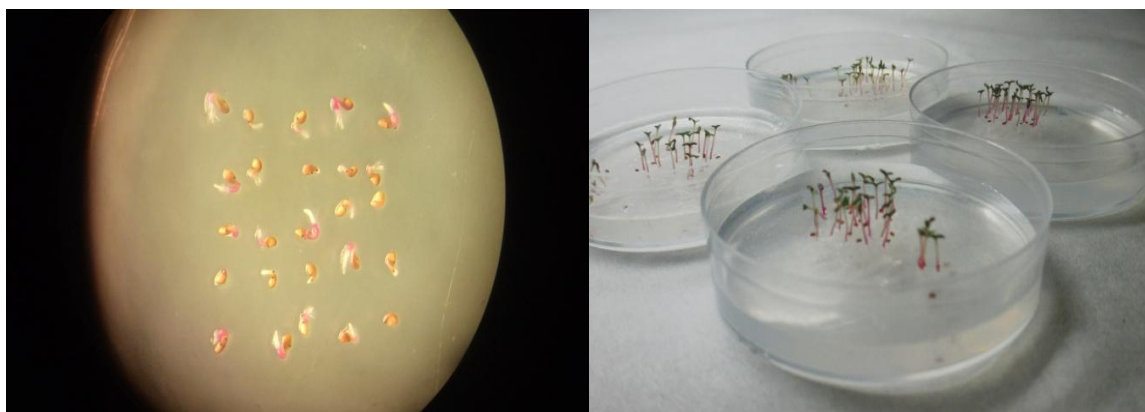


Fig. 37. L'emergència radicular apreciada en la lupa binocular correspon a la tercera fase de germinació de llavors de *Mesembryanthemum nodiflorum* L. sembrades (imatge esquerra). Resposta germinativa en 4 rèpliques de 25 llavors sembrades (imatge dreta). Ambdós casos pertanyents a l'estratificació a 4 mesos (45°C, 30% HR) i, posterior escarificació química d'1' i sembra a 25/10°C.

3.5 Estudis de permeabilitat de la coberta seminal

Encara que el contingut hídic percentual pertanyent al pes en sec de la llavor fou lleugerament superior front al pes en fresc (Taula 12), el contingut arribava a penes al 20% a excepció d'aquelles llavors sotmeses a escarificació física i humidificació, que donà lloc

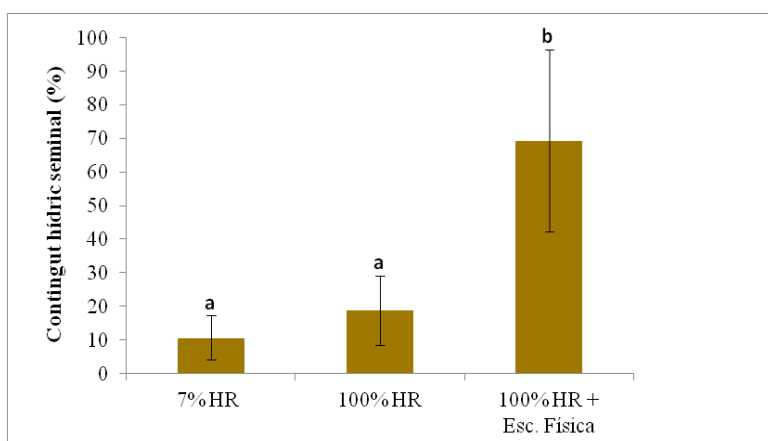


Fig. 38. Contingut hídic percentual (\pm d.s.) respecte al pes en sec (BS*) de la llavor. Marc pertanyent a l'anàlisi de la permeabilitat de les cobertes seminals a distintes condicions prèvies a l'obtenció de la BF*. Rebuig de la representació de l'esc. química ja que la suma de la seua d.s. originava alteracions en el processament estadístic.

a una imbibició superior al 50%. Tanmateix, segons la intensitat del tall, aquest resultat comportà una elevada variabilitat entre llavors, reflectida amb una desviació pròxim al 30 (Fig. 38).

Taula 12. Contingut hídic percentual (\pm d.s.) respecte al pes en fresc (BF) i en sec (BS) de la llavor procedent de l'examinació de la permeabilitat de cobertes intactes o escarificades a distintes condicions d'HR (%).

HR (%) de l'ambient hermètic	Contingut hídic seminal (%)	
	BF	BS
7	9,4 \pm 5,4	10,7 \pm 6,5
100	18,2 \pm 14,6	18,9 \pm 10,3
Escarificació àcida	31 \pm 20,6	21,6 \pm 14,4
Escarificació física + 100	49,7 \pm 12,9	69,3 \pm 27

4. DISCUSSIÓ

L'objectiu últim de les llavors es garantir la descendència i la perpetuació de l'espècie i, com a conseqüència, les plantes desenvolupen distintes estratègies per tal d'aconseguir dit objectiu, entre elles, la distribució de la germinació en l'espai i en el temps. De fet, la distribució temporal es controlada per l'estat fisiològic de les llavors que els permet germinar en diferents períodes per tal d'evitar la competència o l'extinció en presència de condicions adverses (Nonogaki, 2014). Per tant, nombroses plantes desenvolupen fenòmens de dormició (Bewley et al., 2013), que assegurin la germinació en el moment adequat (Kai Shu et al., 2016) i entre elles, algunes espècies d'ambients salins concentren els períodes de germinació en aquells moments en què les condicions ambientals són més favorables i faciliten una menor concentració de sal en el sòl (Godoi & Takaki, 2004).

El transcurs d'aquesta investigació permeté deduir que l'halòfita herbàcia *M. nodiflorum* L. posseïa evidents mecanismes de dormició que prevenien la germinació. L'anàlisi de les característiques morfològiques de les llavors (grandària, estat de l'embrió i la coberta) i l'avaluació de la resposta mitjançant els tractaments pregerminatius sota una revisió bibliogràfica (Baskin & Baskin, 1998; Baskin & Baskin, 2004; Saatkamp et al., 2014), indicà que el tipus de dormició exhibit no es deu a causes fisiològiques, sinó físiques. En concret, la coberta es comportà com una barrera física que reforçà el bloqueig de la germinació ja que uns teguments endurits impedièren la hidratació i/o respiració de l'embrió com senyalen altres autors com (Sánchez et al., 2001; Munawar et al., 2015). Marc corroborat amb les tècniques d'escarificació i l'examinació de la permeabilitat de la coberta seminal.

Per una banda, com s'aprecia en la Fig. 27, mentre l'escarificació mecànica sols deteriorava l'extrem apical de la coberta amb elevades desviacions; el remull abradiu d'1' amb àcid sulfúric enlloc de 2' per tal d'evitar la mort de la llavor, debilità homogèniament la coberta i així, originà una major imbibició de l'embrió durant els rentats. Per tant, a rang tèrmic òptim, les respostes germinatives més favorables (germinació superior al 90% entre 2 i 3 dies) s'aconseguien únicament en aquells protocols encapçalats per l'escarificació química, tots ells englobats estadísticament en un únic grup homogeni (Fig. 35). Com citarem, el pas pel tracte digestiu d'un animal, l'acció microbiana, menudes oscil·lacions tèrmiques en el sòl o el desgast originat per aquest (trepig, removiment, maresma) són els processos erosius que afecten a les llavors en el saladar i així permeten que aquestes es

dispersen per tal d'evitar que germinen prop de la planta mare (Baskin & Baskin, 1998; Baskin & Baskin, 2000; Zalamea et al., 2015).

Per l'altra banda, les diferències percentuals del contingut hídric respecte al pes en fresc i sec entre grups de llavors intactes i escarificades amb major absorció d'aigua en aquestes últimes (Taula 12), suporta la hipòtesi de la coberta com a barrera, impediment físic.

Per tal que el cicle vital de la planta finalitze amb èxit, la germinació deu transcórrer en una època que maximitze les oportunitats tant per a la instal·lació de les plàntules com el seu creixement posterior. Aprofundint en el cicle vital de *M. nodiflorum* L., germina en hivern, floreix en primavera i les llavors madures romanen al llarg de l'estiu a dintre dels fruits de la mata mare seca fins que són disseminades a les darreries d'aquesta estació (Gutterman, 1980; Gutterman & Gendler, 2005). Sense la possessió de mecanismes latents com la dormició, les llavors germinarien prematurament durant les puntuals pluges d'estiu i per la qual cosa, les plàntules resultants no resistirien la sequera, la intensa insolació i les elevades temperatures, trets característics estivals del macrobioclima Mediterrani.

Després de ser dispersades, una proporció activa de llavors de l'herba gelada constitueixen un banc persistent en el sòl i durant el temps que romanen en ell, estan sotmeses a altres molts factors que poden interrompre la dormició i així poder germinar quan les condicions seran favorables (Ungar, 1995). Entre els processos propis del saladar, tenen lloc períodes temporals d'inundacions amb hidratació i deshidratació de llavors, exposició a elevades concentracions de sal amb oscil·lacions de la salinitat o tèrmiques en el substrat. El disseny experimental desenvolupat ha pretès recrear aquestes condicions ambientals i reproduir els patrons que tenen lloc en el medi natural de l'espècie d'estudi. Malgrat això, ningun dels pretractaments germinatius aplicats a excepció de l'escarificació comentada anteriorment, ha tingut un efecte manifest, patent en la ruptura de la dormició seminal.

Les temperatures estivals de regions mediterrànies i subtropicals simulades mitjançant l'estratificació càlida al llarg de dotze setmanes devia intervenir activament en la postmaduració de les llavors a germinar. Per contra, tant el rang 20/35 com 45°C contribuïren a perdurar la dormició, plasmada en una resposta germinativa que no superà el 20% (Taula 18). El mínim increment a 45°C fou causat possiblement per la disminució de la HR en un 40% ja que com a regla general en conservació vegetal, existeix una relació proporcional entre el rang d'humitat i temperatura amb l'envelliment de la llavor (ENSCONET, 2009). Aquest patró fou contrastat quan en l'estratificació càlida de 45°C a

vuit mesos i prèvia a l'escarificació (Fig. 31), l'augment de la humitat fins al 60% desencadenà una mortalitat generalitzada en les llavors i per tant, una germinació nul·la.

La sensibilitat de les llavors a l'estrès hídric és variable d'acord l'espècie (Zhu, 2001; García, 2002; Gul et al., 2013). I és que durant l'etapa de germinació, la llavor pot deshidratar-se i retornar a un estat inicial. En general, els assecats no afecten negativament a les llavors de *M. nodiflorum* L., les quals poden posteriorment tornar a hidratar-se i reiniciar el procés de germinació. No obstant, com ocorre també en espècies lleguminoses, una deshidratació prolongada prèvia a la recol·lecció i potenciada en el laboratori a través d'una estratificació càlida pot originar una major duresa de les llavors, per la qual cosa desemboca en una lenta imbibició i per tant, en una velocitat de germinació menor (Baskin et al., 2002). Idèntic patró germinatiu es repeteix en el pretractament corresponent al xoc tèrmic de 70, 80 i 100°C (Fig. 23). La imitació experimental de l'ambient extremadament càlid aconseguit en el sòl del saladar durant aquells dies estivals més calorosos ha provocat no sols el possible col·lapse de la coberta, sinó la incapacitat de tolerar i per tant la inviabilitat de gran part de les llavors a mesura que augmentava la temperatura i la duració del xoc (Daws et al., 2007).

Altres pertorbacions com la velocitat a la que es dona la imbibició, l'excés d'aigua o les baixes temperatures poden influir en la germinació. Per exemple, un remull control (aigua destil·lada) de les llavors de *M. nodiflorum* L. d'una a quatre setmanes comportà l'arribada dificultosa de d'oxigen a l'embrió, sumat a una germinació del 5% corresponent a aquelles no dorments. En el cas de les baixes temperatures, les llavors sotmeses a l'estratificació freda a 5°C durant quatre mesos (Fig. 17) es convertí en una condició desfavorable per a l'eixida de la dormició ja que és absent en el sud d'Alacant, on els hiverns tendeixen a ser més suaus amb temperatures mínimes superiors a 5°C. En canvi, si que s'ha contrastat la idoneïtat d'aquesta estratificació en espècies halòfites que adopten dormició i banc de llavors en deserts gèlids de regions caucàsiques, siberianes (Bhoyar et al., 2010; Batoul et al., 2012; Cao et al., 2014).

Com sabem, la salinitat edàfica és una de les forces selectives més potents en l'etapa de germinació i d'establiment de les plàntules i, en diverses ocasions la tolerància a la sal es pot interpretar com una tolerància a un major estrès hídric (Zaheer & Khan, 2010; Ghulam et al., 2016). Per exemple, les llavors d'espècies oportunistes nitròfiles com la sosa (*Salsola oppositifolia* Desf.) o la barrella d'Alacant (*Halogeton sativus* Loefl.) presenten

elevades taxes de germinació en qualsevol concentració salina, fins i tot a 800 mM (Monllor, 2012).

Ajustat al nostre cas, les respostes germinatives derivades dels haloprimings no superaren el 10% en el gradient creixent de concentracions salines (Taula 5, Taula 6) i el lleuger increment en la seqüència dels cicles d'hidratació (Fig. 22) tal vegada fou causat per l'estímul de les fluctuacions d'humitat. L'exposició de les llavors de *M. nodiflorum* L. d'un a tres mesos en solucions salines originà una inhibició total de la germinació respecte al remull control (aigua destil·lada); circumstància comprovada per altres autors (Munns, 2002). En aquest sentit, l'únic assaig halopriming (cicle d'hidratació) que aconseguí un elevada germinació fou motivat perquè s'aplicà prèviament una escarificació amb àcid. Assaig que permeté comprovar un augment del rendiment de la germinació front a l'estrès salí i la vigor potencial de llavors envellides com també analitzaren altres autors (Amjad et al., 2007).

Una planta necessita completar el seu cicle vital en ambients salins per a ser considerada adaptada a aquest tipus d'hàbitat, on les espècies es distribueixen d'acord la concentració de sal en el sòl (Costa & Boira, 1981; Boix, 1987; Alcaraz & De la Torre, 1988). Això sí, tant l'èxit de germinació com el patró d'establiment no depèn expressament de la limitació salina, sinó d'altres factors com la disponibilitat d'aigua i de nutrients, el pH, entre altres. Factors òptims per a la germinació que no coincideixen necessàriament amb els de desenvolupament de les plàntules (Woodell, 1985; Noe & Zedler, 2000).

Més enllà dels factors ambientals, cal posar en relleu la importància del valor adaptatiu en el comportament germinatiu i distribució a través del coneixement de la facilitat de colonització i/o la competitivitat front a altres espècies en què comparteixen hàbitat (Waisel, 1972; Flowers et al., 1986).

Encara que la temperatura és un dels factors referents en l'avaluació de respostes germinatives, en diverses ocasions no aporta patrons de distribució concloents (Rivers & Weber, 1971; Zaheer & Khan, 2010). Per tant, s'opta per l'estimació del temps tèrmic (S) i la temperatura base (T_b), indicadors que prediuen el ritme de germinació i la citada competitivitat (Trudgill et al., 2005). D'aquest mode, aquelles espècies de saladar que presenten valors de temps tèrmic elevats (rectes de regressió amb pendent menuda) són menys competitives. Es el cas de l'herba gelada (*M. nodiflorum* L.): 50'5°C/dia com s'aprecia en la Fig. 30 o com es repeteix amb altres plantes de saladar (Monllor 2012): la

cabridella (*Aster tripolium* L.): 100°C/dia, l'ensopeguera de roca (*Limonium virgatum* Willd.): 109,89°C/dia o l'herba salada (*Sarcocornia fruticosa* Scott.): 161,29°C/dia.

En canvi, S menudes li corresponen pendents grans en l'equació de la recta i per la qual cosa, les espècies tendeixen a posseir un comportament més competitiu, més oportunista; mostra d'això són els elevats percentatges de germinació que aconseguixen en amplis rangs tèrmics i en menys de 48 h. En aquest grup (Monllor, 2012), destaca la Trenca l'olla de Santa Pola (*Limonium santapolense* Erben): 2,61°C/dia o el Limòni de La Marina (*Limonium rigualii* M. B. Crespo & Erben): 21,28°C/dia.

Com s'ha demostrat, no totes les espècies tenen idèntica capacitat de dispersar-se, ni idèntica habilitat competitiva. Com a resultat del treball en conjunt, es pot indicar que l'espècie halòfita d'estudi *Mesembryanthemum nodiflorum* L. presenta una colonització basada en una elevada taxa de creixement durant el seu cicle anual com ocorre similarment amb *Mesembryanthemum crystallinum* L. (Vivrette & Muller, 1977). Tanmateix, la planta d'estudi és moderadament competitiva i d'aquest mode, assegura la supervivència de les seues poblacions mitjançant l'eleva síntesi de menudes llavors i l'elevada proporció de llavors dorments en el banc del sòl. Açò garanteix l'amplia disseminació amb majors oportunitats de trobar un lloc favorable per germinar i reclutar d'individus joves de forma constant i escalonada al llarg del temps. Finalment, una vegada establertes les condicions òptimes de germinació i els mètodes pregerminatius adequats en el trencament de la dormició, seria interessant aprofundir en el desenvolupament de futurs estudis basats en la tolerància germinativa d'aquesta espècie a la concentració salina edàfica.

4. CONCLUSIONS

El present projecte pretenia determinar els mecanismes adaptatius endògens que justifiquen la propagació de *Mesembryanthemum nodiflorum* L. en saladars de clima mediterrani mitjançant la fase més sensible de qualsevol cicle biològic vegetal: la fase germinativa. I com no, la transcendència en aquesta de la dormició, la qual es pot prolongar multitud d'anys sense comprometre la viabilitat de la llavor, d'unes petites càpsules vives que conserven embrions.

Ja no només en herbàcies halòfites anuals o perennes, sinó milers de plantes de multitud de famílies, de distints hàbitats poden donar lloc a un banc natural de llavors, madur i dormant a l'espera que les temperatures es suavitzen o l'efecte de qualsevol estrès es debilita i així garantir en últim lloc, la supervivència de la plàntula en aquelles condicions més

adequades. Els bancs són les xarxes de seguretat per tal de preservar la continuïtat de les poblacions front a una hipotètica mortalitat a causa de canvis ambientals sobtats.

Una vegada les llavors de l'halòfita herbàcia *Mesembryanthemum nodiflorum* L. foren recol·lectades i traslladades al Banc de Germoplasma del Jardí Botànic de la UV, l'haver inclòs una sèrie de pretractaments en els protocols de germinació demostra les evidències de la seua efectivitat potencial d'acord els requeriments de l'espècie vegetal. Dits tractaments pregerminatius han intentat recrear i ajustar experimentalment en un laboratori els estressos ambientals freqüents en un saladar i que pertorben la fase germinativa, la primera que deu superar qualsevol planta en un medi concret i la primera que expressa el caràcter fenotípic inicial. És indiscutible al fi i al cap, la capacitat d'aquests tests d'eliminar períodes latents, d'agilitzar i sincronitzar respostes germinatives o potenciar la robustesa de llavors envellides.

A mode de conclusió, podem afirmar que l'espècie d'estudi posseeix llavors amb dormició física, la germinació de la qual depèn del trencament de la coberta seminal i per tant, el pretractament més efectiu ha sigut l'escarificació química. Tanmateix, és rellevant destacar que la resposta relativa al percentatge de germinació, a les distintes condicions de temperatura estudiades, és positiva en un ampli rang (15-25°C), sense apreciar diferències importants entre els règims alternants i constants ja que oscil·la entre un 89 i un 99%. Tenint en compte la velocitat de germinació, s'ha determinat que la temperatura òptima correspon a 24,2°C.

Ara per ara, les investigacions com la present centrades en l'enteniment del comportament germinatiu i les adaptacions que permeten a les poblacions mantenir-se estables any rere any en ecosistemes halòfils han demostrat la seua utilitat com a eines de treball en planificació i gestió d'estratègies de conservació i restauració d'hàbitats. Precisament en aquells on creix una vegetació sotmesa a una intensa pressió ambiental i antròpica com ocorre en el litoral semiàrid del sud d'Alacant. En definitiva, el poder identificar les espècies que actuen potencialment com a colonitzadores en un hàbitat específic com pot ser *Mesembryanthemum nodiflorum* L. és essencial ja que poden ser les plantes idònies en donar el primer pas a l'hora de salvaguardar un espai natural de la seua desaparició.

LLISTA D'ABREVIATURES I SÍMBOLS

BF: pes en micrograms del pouet amb una llavor fresca

BS: pes en micrograms del pouet amb la llavor assecada

IUCN: International Union for Conservation of Nature

n: número total de llavors sembrades en rèplica

ppm: part per milió d'una concentració

RECONeixEMENTS

Arribats a aquest punt, finalitza el meu TFG i per tant, la meua estància en un singular oasis enmig de la ciutat de València: el Jardí Botànic. Cal remuntar-se allà pel juliol de 2015 quan vaig tocar la porta del despatx de la que fou la meua professora de Geobotànica (i la posterior tutora del present TFG) per tal d'iniciar una col·laboració amb el Banc de Germoplasma del Jardí. En aquell moment, mai hauria pensat en la intensa experiència acadèmica que s'apropava... El laboratori del Banc ha sigut testimoni de les incomputables hores de paciència i sospirs, d'esforç i suor que hi ha al darrere de l'escriptura d'aquestes pàgines. No obstant, ha sigut també testimoni se'ns dubte dels llaços que me'n porte, d'una confluència d'aprenentatge, de curiositat, de generositat i sobretot, d'anècdotes i rialles.

Donar les gràcies especialment a tres persones, unes autèntiques “mares” fora de casa per haver facilitat una atmosfera dinàmica i agradable d'assessorament constant ja més enllà de la resolució de casos experimentals i disposició d'eines informàtiques, de laboratori... La Dr. Pilar Soriano (professora del Dept. de Botànica i Geologia de la UV) i, Elena Estrelles i Sefa Prieto (conservadora i tècnica superior d'investigació respectivament del Banc de Germoplasma) han dedicat molt de temps en instruir-me en fisiologia i ecologia vegetal perquè al fi i al cap, el TFG arribara a bon port després d'haver lidiat amb multitud d'altabaixos sorgits al llarg de l'etapa experimental. A més, l'adaptació del present TFG ha comportat la publicació en dos parts d'un article divulgatiu en una revista digital el passat desembre i ara cap la possibilitat de ser reconvertit en article científic al llarg d'aquest any.

No desitjaria acabar sense posar en relleu durant el meu pas pel Jardí, la devoció i l'ajuda desinteressada de la tècnica responsable de la Biblioteca José Pizcueta, M^a José Borràs, la qual m'ha donat a conèixer multitud d'eines informàtiques del Servei de Biblioteques i Documentació de la UV. Com també, el Dept. de Comunicació i Cultura, el qual m'ha donat l'oportunitat de potenciar la meua vena comunicativa en la revista digital Espores, la Veu del Jardí.

FINANÇAMENT

La present investigació científica no ha rebut cap ajut econòmic específic de ninguna agència de finançament procedent del sector públic, comercial o sense ànim de lucre. No obstant això, cal accentuar el suport material íntegre per part del Banc de Germoplasma del Jardí Botànic de la UV durant la realització del present Treball de Fi de Grau de Biologia.

6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

Presentat d'acord els criteris orientatius de la revista científica elegida, el ventall de fonts bibliogràfiques inclou les pàgines web de consulta, els enllaços d'aquestes han sigut simplificats mitjançant l'eina informàtica Bitly i el seu funcionament pot variar depenent del navegador web utilitzat.

Afzal, I., Rauf, S., Basra, A. S. & Murtaza, G. (2008). Halopriming improves vigour, metabolism of reserves and ionic contents in wheat seedlings under salt stress. *Plant Soil Environ.* **54**, 382-388.

Akhani, J., Malekmohammadi, M., Mahdavi, P., Gharibyan, A. & Chase M. (2013). Phylogenetics of the Irano-Turanian taxa of *Limonium* (Plumbaginaceae) based on ITS nrDNA sequences and leaf anatomy provides evidence for species delimitation and relationships of lineages. *Bot. J. Linn. Soc.* **171**, 519-550.

Alcaraz, F. (2012). Geobotànica. Disponible a <https://goo.gl/M5W41e> [consulta juliol de 2016].

Alcaraz, F. & De la Torre, A. (1988). Notas fitosociològiques sobre el Sudeste Ibérico. *Acta Bot. Malacitana.* **13**, 332-341.

Alcaraz, F., Díaz, T. E., Rivas-Martínez, S. & Sánchez-Gómez. (1989). Datos sobre la vegetación del sureste de España: provincia biogeográfica Murciano-Almeriense. *Itinera Geobot.* **2**, 5-133.

Al Hassan, M., Chaura, J., López-Gresa, M. P., Borsai, O., Daniso, E., Donat - Torres, M. P., Mayoral, O., Vicente, O. & Boscaiu, M. (2016). Native-Invasive Plants vs. Halophytes in Mediterranean Salt Marshes: Stress Tolerance Mechanisms in Two Related Species. *Front. Plant Sci.* **7**, 473.

Alonso, M. A. (2000). Estudio geobotánico de los saladares del sureste peninsular (Albacete, Alicante, Almería, Murcia). [Tesis]. Universidad de Alicante: Dpto. de Ciencias Ambientales y Recursos.

- Álvarez, J., Ortiz, S. R. & Alcaraz Ariza, F.** (2001). Edaphic characterization and soil ionic composition influencing plant zonation in a semiarid Mediterranean salt marsh. *Goderm.* **99**, 81-98.
- Amjad, M., Ziaf, K., Iqbal, Q., Ahmad, I., Atif M. & Ahmad Z. S.** (2007). Effect of seed priming on seed vigour and salt tolerance in hot pepper. *Pak. J. Agri. Sci.* **44**, 408-416.
- Apel, K. & Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 373-399.
- Azcón-Bieto, J. & Talón, M.** (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Barcelona: McGraw-Hill.
- Baskin, J. M. & Baskin, C. C.** (1998). *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. New York: Academic Press.
- Baskin, J. M. & Baskin, C. C.** (2000). Evolutionary considerations of claims for physical dormancy-break by microbial action and abrasion by soil particles. *Seed Sci. Res.* **10**, 409-413.
- Baskin, C. C., Zackrisson, O. & Baskin, J. M.** (2002). Role of warm stratification in promoting germination of seeds of *Empetrum hermaphroditum* (Empetraceae), a circumboreal species with a stony endocarp. *Am. J. Bot.* **89**, 486-493.
- Baskin, J. M. & Baskin, C. C.** (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* **14**, 1-16.
- Basra, A. S. & Basra, R. K.** (1997). *Mechanism of environmental stress resistance in plants*. Amsterdam: Harwood Academic.
- Batoul, N. A., Partzsch, M. & Hensen, I.** (2012). Effects of temperature, salinity and cold stratification on seed germination in halophytes. *Nord. J. Bot.* **30**, 627-634.
- Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M. & Nonogaki, H.** (2013). In *Seeds: Physiology, Development, Germination and Dormancy*. New York: Springer.
- BGCI.** (2012). *International Agenda for Botanic Gardens in Conservation*. London: Botanic Gardens Conservation International.
- Bhoyar, M., Mishra, G. P., Singh, R. & Singh B.** (2010). Effects of various dormancy breaking treatments of the germination of wild caper (*Capparis spinosa*) seeds from the cold arid desert of trans-Himalayas. *Indian J. Agr. Sci.* **80**, 621.

Bioversity International: Research for development in agricultural and tree biodiversity. (2017). Disponible a <https://goo.gl/ZSaHkb> [consulta maig de 2017].

Boix, M. (1987). Humedales y áreas lacustres de la Provincia de Alicante. [Tesis]. Alicante: Universidad de Alicante.

Brenchley, J. L. & Probert, R. J. (1998). Seed germination responses to some environmental factors in the sea grass *Zoostera capricorni* from eastern Australia. *Aquat. Bot.* **62**, 177-188.

Canales M. G.; Giménez F. P. & Larrosa R. J. A. (2011). Agua y paisaje: las transformaciones del territorio en el curso bajo de los ríos Vinalopó y Segura. In *Paisaje y Geografía en tierras alicantinas* (ed. M. G. Canales), pp. 153-159. Alicante: Asociación de Geógrafos Españoles, Universidad de Alicante.

Cantos, J. O. (2009). Cambio climático y riesgos climáticos en España. *Invest. Geogr.* **49**, 197-220.

Cao., D., Baskin, C. C., Baskins, J. M., Yang, F. & Huang, Z. (2014). Dormancy cycling and persistence of seeds in soil of a cold desert halophyte shrub. *Annals of Bot. London.* **113**, 171-179.

Castroviejo, S. (1986-2012). Flora ibérica. 1-8, 10-15, 17-18, 21. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC. Disponible a <https://goo.gl/DYyye5> [consulta febrer de 2016].

Costa M. & Boira H. (1981). La vegetación costera valenciana: los saladares. *An. Jard. Bot. Madr.* **38**, 233-244.

Davis, T. J., Blasco, D. & Carbonell, M. (1996). *Manual de la Convención de Ramsar*. Madrid: Organismo Autónomo de Parques Nacionales.

Daws, M. I., Kabadajic, A., Manger, K. & Kranner, I. (2007). Extreme thermo-tolerance in seeds of desert succulents in related to maximum annual temperature. *S. Afr. J. Bot.* **73**, 262-265.

Díaz, A. (2012). Biogeografía. Disponible a <https://goo.gl/ph6QR8> [consulta abril de 2017].

Donohue, K., Rubio de Casas, R., Burghardt L., Kovach, K. & Willis C. G. (2010). Germination, Postgermination Adaptation, and Species Ecological Ranges. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S.* **41**, 293-319.

El-Keblawy. (2013). Effects of seed storage on germination of two succulent desert halophytes with little dormancy and transient seed bank. *Acta Ecologica Sinica*. **33**, 338-343.

ENSCONET. (2009). *Seed Collecting Manual for Wild Species*. UK, Kew: Royal Botanic Gardens.

Estrelles, E., Fuentes, N., Prieto, J., Boscaiu, M., Ballesteros, D. & Ibars, A. M. (2004). Threatened Valencian Flora: Initiatives for its conservation. In *Seed Conservation: Turning science into practice* (ed. R. D. Smith, J. B. Dickie, S. H. Linington, H. W. Pritchard and R. J. Probert), pp 857-868. UK, Kew: Royal Botanic Gardens.

European Commision. (2007). *Interpretation manual of European habitats – EUR27*. Brussels: European Commission, DG Environment, Nature and Biodiversity.

FAO. (2016). El estado mundial de la alimentación y la agricultura. Cambio climático, agricultura y seguridad alimentaria. Disponible a <https://goo.gl/1HKLRT> [consulta juny de 2017].

Flowers, T. J., Hajibagheri, M. A. & Clipson, N. W. J. (1986). Halophytes. *Quart. Rev. Bio.* **61**, 313-335.

Flowers, T. J. & Colmer, T. D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol.* **179**, 945-963.

Fos, S., Laguna, E. & Jiménez, J. (2014). Plant Micro-Reserves in the Valencian Region (E of Spain): are we achieving the expected results? Passive conservation of relevant vascular plant species. *Fl. Medit.* **24**, 153-162.

García, O. A. (2002). *Ecofisiologia vegetal. Introducció a la fisiologia de l'estrès*. Valencia: UPV.

Generalitat Valenciana. Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural. (2015). Parcs Naturals de la Comunitat Valenciana. Disponible a <https://goo.gl/L6x9jS> [consulta juliol de 2017].

Ghulam, R. S., Hameed, A., Zaheer, M. A., Khan, M. A. & Gul, B. (2016). Comparison of seed germination and recovery responses of a salt marsh halophyte *Halopeplis perfoliata* to osmotic and ionic treatments. *Pak. J. Bot.* **48**, 1335-1343.

Godoi, S. & Takaki, M. (2004). Effects of light and temperature on seed germination in *Cecropia hololeuca* Miq. (Cecropiaceae). *Braz. Arch. Biol. Techn.* **47**, 185-191.

Gold, K. & Hay, F. (2008). Equilibrating seeds to specific moisture levels. *Technical Information Sheet 09*. UK, Kew: Royal Botanic Gardens.

Grigore, M. N., Boscaiu, M. & Vicente, O. (2011). Assessment of the relevance of osmolyte biosynthesis for salt tolerance of halophytes under natural conditions. *Eur. J. Plant. Sci. Biotech.* **5**, 12-19.

Guara, M., Mateu, I., Montesinos, D. & Segarra, J. G. (1998). Informe final del convenio de colaboración para la investigación del sistema reproductivo y variabilidad genética de las especies vegetales vasculares raras, endémicas o amenazadas de la Comunidad Valenciana. Valencia: Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient, Canvi Climàtic i Desenvolupament Rural de la Generalitat Valenciana.

Gul, B., Ansari, R., Flowers, T. J. & Khan, M. A. (2013). Germination strategies of halophyte seeds under salinity. *Environ. Exp. Bot.* **92**, 4-18.

Guttermann, Y. (1980). Annual rhythm and position effect in the germinability of *Mesembryanthemum nodiflorum*. *Israel J. Bot.* **29**, 93-97.

Guttermann, Y. (1994). Long-term seed position influences on seed germinability of the desert annual, *Mesembryanthemum nodiflorum* L. *Israel J. Plant Sci.* **42**, 197-205.

Guttermann, Y. & Gendler, T. (2005). Annual rhythm of germination of seeds of *Mesembryanthemum nodiflorum* 32 years after collection. *Seed Sci. Res.* **15**, 249-253.

Herre, H. & Bolus, H. (1971). The genera of Mesembryanthemaceae. Cape Town: Tafelberg-Uitgewers Beperk.

Institute of Sustainable Halophyte Utilization. (2011). Pakistan: University of Karachi. Disponible a <https://goo.gl/GGJd5K> [consulta març de 2016].

ISTA. (1999). *International rules for seed testing: rules 1999*. Zurich: International Seed Testing Association.

ISTA. (2006). *International rules for seed testing: rules 2006*. Zurich: International Seed Testing Association.

Kai Shu, Xiaodong Liu, Qi Xie & Zu-hua He. (2016). Two Faces of One Seed: Hormonal Regulation of Dormancy and Germination. *Mol. Plant.* **9**, 34-45.

Khan, M. A. (1990). The relationship of seed bank to vegetation in a saline desert community. In *Marvel of Seeds: Proc. Intern. Seed Symp Jodhpur India* (ed. D. Sen and S. Mohammed), pp. 87-92. India: University of Jodhpur.

- Khan, M. A. & Gul, B.** (1998). High salt tolerance in germinating dimorphic seeds of *Arthrocnemum indicum*. *Int. J. Plant Sci.* **159**, 826-832.
- Khan, M. A. & Ungar I. A.** (1997). Effects of thermoperiod on recovery of seed germination of halophytes from salines conditions. *Am. J. Bot.* **84**, 279-283.
- Khan, M. A., Gul, B. & Weber, D.** (2000). Germination responses of *Salicornia rubra* to temperatura and salinity. *J. Arid Environ.* **45**, 207-214.
- Khan, M. A. & Gulzar, S.** (2003). Light, salinity and temperature effects on the seed germination of perennial grasses. *Am. J. Bot.* **90**, 131-134.
- Khan, M. A. & Rayner, G. D.** (2003). Robustness to non-normality of common tests for the many-sample location problem. *J. Appl. Math. Sci.* **7**, 187-206.
- Khan, M. A. & Weber D. J.** (2006). *Eco-physiology of high salinity tolerant plants*. Amsterdam: Springer Verlag.
- Laguna, E.** (2003). *Hàbitats Prioritaris de la Comunitat Valenciana: valors Faunístics y Botànics*. Valencia: Conselleria d'Habitatge, Obres Públiques i Vertebració del Territori de la Generalitat Valenciana.
- Lutts, S., Benincasa, P., Wojtyla, L., Szymon K. S., Pace, R., Lechowska, K., Muriel, Q. & Malgorzata, G.** (2016). Seed Priming: New Comprehensive Approaches for an Old Empirical Technique. In *New Challenges in Seed Biology - Basic and Translational Research Driving Seed Technology*. (ed. S. Araújo and A. Balestrazzi), pp. 1-45. Portugal: Institute of Chemical and Biological Technology.
- Manzoor, S., Hameed, A., Khan, M. A. & Gul, B.** (2017). Seed germination ecology of a medicinal halophyte *Zygophyllum propinquum*: responses to abiotic factors. *Flora*. **233**, 163-170.
- Monllor, M. R.** (2012). Análisis del comportamiento germinativo en especies halotolerantes. [TFG]. Gandia: UPV.
- Munawar, S., Naeem, M., Ali, H. H., Jamil, M., Iqbal, M., Nazir, M. Q., Balal, R. M. & Safdar, M. E.** (2015). Seed dormancy breaking treatments for African purslane (*Zaleya pentandra*). *Planta Daninha*. **33**, 623-629.
- Munns, R.** (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* **25**, 239-250.

Noe, G. B. & J. B., Zedler. (2000). Differential effects of four abiotic factors on the germination of salt marsh annuals. *Am. J. Bot.* **87**, 1679-1692.

Nonogaki, H. (2014). Seed dormancy and germination-emerging mechanisms and new hypotheses. *Front. Plant Sci.* **5**, 233.

Oh, D. H., Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Pantoja, O., Lee, S. Y., Bohnert, H. & J., Dassanayake, M. (2015). Cell type-specific responses to salinity - the epidermal bladder cell transcriptome of *Mesembryanthemum crystallinum*. *New Phytol.* **3**, 627-644.

Parra, B. L. (2012). Efectos de distintos niveles de salinidad en especies halófilas en un saladar del Sud de Alicante. [TFG]. UPV: Escuela Politécnica Superior de Gandía.

Pasternak, D. (1987). Salt tolerant and crop production - A comprehensive approach. *Annu. Rev. Phytopathol.* **25**, 271-291.

Pujol, J. A., Calvo J. F. & Ramírez-Díaz L. (2001). Seed germination, growth, and osmotic adjustment in response to NaCl in a rare succulent halophyte from southeastern Spain. *Wetl.* **21**, 256-264.

Rasband, W. (1997-2015). ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, State University of New York and Stony Brook. Disponible a <https://goo.gl/Gt7H4Z> [consulta juliol de 2017].

Rivas-Martínez, S. (1983). Pisos bioclimáticos de España. *Lazaroa.* **5**, 33-43.

Rivas-Martínez, S. & Rivas-Sáenz, S. (1996-2009). Sistema de Clasificación Bioclimática Mundial. Madrid: Centro de Investigaciones Fitosociológicas. Disponible a <https://goo.gl/WUyd8l> [consulta abril de 2017].

Rivers, W. G. & Weber, D. J. (1971). The influence of salinity and temperature on seed germination in *Salicornia bigelovii*. *Physiol. Plantarum.* **24**, 73-75.

Royal Botanic Gardens. (2014). Post-harvest handling of seed collections. UK, Kew: Millenium Seed Bank Partnership. Disponible a <https://goo.gl/PRL7ud> [consulta juliol de 2017].

Saatkamp, A., Poschlod, P. & Venable, D. L. (2014). The Functional Role of Soil Seed Banks in Natural Communities. In *The Ecology of Regeneration in Plant Communities* (ed. R. S. Gallagher), pp. 263-295. UK: Centre for Agricultural Bioscience International.

Sánchez, J. A., Orta, R. & Muñoz, B. C. (2001). Tratamientos pregerminativos de hidratación-deshidratación de las semillas y sus efectos en plantas de interés agrícola. *Agron. Costarric.* **25**, 67-92.

The Plant List: A working list of all plant species. (2013). Disponible a <https://goo.gl/cQiQj1> [consulta març de 2016].

Trudgill, D., Honek, A., Li, D. & Van Straalen, N. (2005). Thermal time-concepts and utility. *An. Appl. Biol.* **146**, 1-14.

Ungar, I. A. (1995). Seed germination and seed-bank ecology in halophytes. In *Seed development and seed germination* (ed. J. Kigel and G. Galili), pp. 599-628. New York: Marcel Dekker, Inc.

Ungar, I. A. (2001). Seed banks and seed population dynamics of halophytes. *Welt. Ecol. Ma.* **9**, 499-510.

Valdés, C. B., Talavera L. S. & Fernández-Galiano. F. E. (1987). Flora Vascular de Andalucía Occidental. Barcelona: Ketres S.A. Disponible a <https://goo.gl/2rsqQD> [consulta febrer de 2016].

Venable, D. L. (2007). Bet hedging in a guild of desert annuals. *Ecology.* **88**, 1086-1090.

Vivrette, N. J. & Muller C. H. (1977). Mechanism of Invasion and Dominance of Coastal Grassland by *Mesembryanthemum crystallinum*. *Ecol Monogr.* **47**, 301-318.

Waisel, Y. (1972). *Biology of Halophytes*. London, New York: Academic Press Physiological Ecology.

Walck, J. L., Hidayati, S. N., Dixon, K. W., Thompson, K. & Poschlod P. (2011). Climate change and plant regeneration from seed. *Glob. Change Biol.* **17**, 2145-2161.

Wiley, J. S. (1999-2017). New Phytologist Trust. Disponible a <https://goo.gl/PyDhSB> [consulta març de 2016].

Woodell, S. R. J. (1985). Salinity and seed germination patterns in coastal plants. *Vegetation.* **61**, 223-229.

Zaheer, A. M. and Khan, M. A. (2010). Tolerance and recovery responses of playa halophytes to light, salinity and temperature stresses during seed germination. *Flora.* **205**, 764-771.

Zalamea, P. C., Sarmiento, C., Arnold, A. E., Davis, A. S. and Dalling, J. W. (2015). Do soil microbes and abrasion by soil particles influence persistence and loss of physical dormancy in seeds of tropical pioneers?. *Fron.t Plant Sci.* **5**, 799.

Zhu, J. (2001). Plant salt tolerance. *I*

